



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA  
PPG-BIONORTE**

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 COMO UM COMPONENTE  
IMUNOMODULADOR NA ARTRITE REUMATOIDE**

**IONE CRISTINA DE PAIVA PEREIRA**

**São Luís**

**2017**

**IONE CRISTINA DE PAIVA PEREIRA**

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 COMO UM COMPONENTE  
IMUNOMODULADOR NA ARTRITE REUMATOIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Rede Bionorte como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Elizabeth Soares Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Augusto Grigolin Grisotto.

São Luís

2017

**IONE CRISTINA DE PAIVA PEREIRA**

**PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR TRPA1 COMO UM COMPONENTE  
IMUNOMODULADOR NA ARTRITE REUMATOIDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Rede Bionorte como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof(a). Dr(a). Elizabeth Soares Fernandes (Orientadora)**

---

---

---

---

“Aos que compartilharam meus ideais,  
incentivando-me a prosseguir nesta jornada.  
Aos que, pelo amor se fizeram presentes.  
Aos que, mesmo distantes, me encheram de  
força.  
Aos que, através do exemplo, lições e  
lembranças me deram direção”.

## AGRADECIMENTOS

A Deus; fonte de todo bem, de todo amor e de toda misericórdia, princípio, meio e fim de todas as coisas...

À minha orientadora Dra.Elizabeth Fernandes, por todo amor à ciência, transbordado no exemplo diário com que se dedica a todas as tarefas, pesquisas e orientandos, por toda paciência e caridade a mim concedida e por todos os ensinamentos e estímulos, sempre doados de maneira gentil e tolerante.

Ao meu co-orientador Marcos Grisoto, pela oportunidade e confiança, mais uma vez a mim concedida e pelo exemplo de retidão e compromisso com a pesquisa.

Aos Programas CAPES, FAPEMA e INCT (INOVAMEDE) pelo incentivo à pesquisa e condições oferecidas para a conclusão deste trabalho.

À Farmácia Estadual de Medicamentos Especializados, por sempre abrir suas portas para contribuir com a pesquisa

À Universidade Ceuma, por toda oportunidade, espaço, disponibilidade de estrutura para a realização de todas as minhas tarefas, seja na docência, seja na pesquisa.

Aos meus amigos e colaboradores, Thayane Muniz, Saulo Figueredo e Domingos Magno, por toda ajuda, pelo tempo doado e por todo sacrifício compartilhado.

À Dra. Mahiba Mahiba Mattar Rahbani de Sousa Martins, pela contribuição com este trabalho.

Ao meu marido Euler Bentes, amigo e parceiro de todas as horas, pelo carinho, paciência e incentivo.

À minha filha Catarina, razão de tudo que faço, para quem me dedico, trabalho, e procuro melhorar e dar exemplo todos os dias.

Aos meus pais, Maria Quintina e Valdimir Pereira, por todo sacrifício de uma vida dedicada aos filhos e por todo exemplo perpetuado em amor.

*“Aqueles que esperam no Senhor renovam as suas forças. Voam alto como águias. Correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam”.*  
*(Isaías 40:31)*

## RESUMO

O receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) é um canal não seletivo para  $\text{Ca}^{+2}$ , expresso em neurônios sensoriais e células não neuronais, o qual medeia a transdução da dor e a inflamação; tendo sido implicado na artrite reumatoide (AR). Este trabalho avaliou a expressão de TRPA1 em leucócitos de sangue periférico de pacientes com AR, bem como sua correlação com a dor e a perda de função articular, além de alterações imunes encontradas em indivíduos com AR recebendo ou não terapia anti-reumática com o modificador da doença leflunomida (LFN) e ou o anti-TNF $\alpha$  adalimumab (ADA); em comparação à indivíduos saudáveis. Amostras de sangue foram coletadas de 15 indivíduos saudáveis (controle), 10 pacientes artríticos não submetidos à terapia anti-reumática específica (NST), 15 pacientes tratados com LFN e 15 pacientes tratados com ADA. Os níveis circulantes de proteína C reativa (PCR), fator reumatóide (FR), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 4-hidroxinonenal (4-HNE) e fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) foram quantificados. Ainda, avaliou-se as populações de leucócitos, o número de hemácias, os níveis de hemoglobina e a expressão de TRPA1 em leucócitos do sangue periférico. Observou-se que a expressão de TRPA1 em leucócitos de sangue periférico está aumentada em pacientes NST, e que isto está associado ao aumento do número de células polimorfonucleares e à ativação de células CD14<sup>+</sup>. Ainda, a expressão de TRPA1 correlaciona-se com a dor e disfunção articular, alterações estas, que encontram-se reduzidas em pacientes tratados com LFN e ADA. Demonstrou-se ainda que o tratamento com LFN ou ADA previne a anemia relacionada à AR, sendo efetivos tanto no tratamento das alterações intra quanto extra articulares decorrentes da doença.. Em conjunto, os dados demonstram que o TRPA1 influencia a resposta dolorosa e a disfunção articular da AR, e que sua expressão é reduzida pelo tratamento com LFN ou ADA. Estas evidências, aliadas com dados promissores na redução da anemia dos pacientes artríticos sugerem que o tratamento com estas drogas anti-reumáticas é efetivo no tratamento de manifestações intra- e extra-articulares da AR.

**Palavras-chave:** Artrite reumatoide; TRPA1; dor; inflamação; alterações imunes; anemia

## ABSTRACT

The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a non-selective  $\text{Ca}^{+2}$  channel expressed on neuronal and non-neuronal cells, and mediates pain and inflammation; being implicated in rheumatoid arthritis (RA). Here, we evaluated the expression of TRPA1 on peripheral blood leukocytes obtained from RA patients, as well as its correlation with pain and disability, in addition to the immune alterations in RA patients treated or not with anti-rheumatic drugs: the disease-modifying agent leflunomide (LFN) and the anti-TNF $\alpha$  adalimumab (ADA); in comparison with healthy subjects. Peripheral blood samples were taken from 15 healthy subjects (controls), 10 RA patients not undertaking anti-rheumatic therapy (NST), 15 patients treated with LFN and 15 patients treated with ADA. C reactive protein (CRP), rheumatoid factor (RF), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 4-hydroxynonenal (4-HNE) and tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) levels were quantified. Also, leukocyte subpopulations, the number of red blood cells, the levels of haemoglobin and the expression of TRPA1 on peripheral blood leukocytes, were evaluated. TRPA1 expression was increased on NST leukocytes and this was correlated with pain and disability and was associated with the number of polymorphonuclear cells and the activation of CD14<sup>+</sup> cells. It was also demonstrated that treatment with either LFN or ADA attenuates anaemia in RA, with those treatments being effective in treating both the intra- and extra-articular disease. Overall, our data shows that TRPA1 influences pain and disability in RA and that its expression is reduced in patients treated with LFN or ADA. These evidences, together with the promising data on the anti-rheumatic therapy in reducing anaemia in RA patients suggest that these drugs are effective in treating both the intra- and extra-articular alterations of RA.

Keywords: Rheumatoid arthritis; TRPA1; pain; inflammation; immune alterations; anaemia

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	–4-hidroxinonenal
4-one	–4-oxononenal
ADA	–Adalimumab
AINEs	–Anti-inflamatórios não-esteroidais
Anti-CCP	–Anticorpos anti-peptídeos citrulinados cíclicos
APC	–Célula apresentadora de antígeno
AR	–Artrite reumatoide
CBA	–Cytometric Bead Array (Matrizes para Citometria)
CD 127	–Receptor de interleucina-7, expresso em vários tipos de células, incluindo células T
CD 14	–Glicoproteína expresso na superfície de monócitos, neutrófilos e células dendríticas
CD 19	–Glicoproteína expressa na superfície de linfócitos B foliculares e células dendríticas
CD 25	–Proteína transmembrana expressa em linfócitos T e B ativados, alguns timócitos, precursores mieloides e oligodendrócitos
CD 69	–Glicoproteína expressa na superfície de linfócitos T ativados e células natural killer
CD4	–Glicoproteína expressa na superfície de algumas células T, macrófagos, monócitos e na célula dendrítica
CD8	–Glicoproteína expressa na superfície de células T citotóxicas, natural Killer, timócitos e células dendríticas
CFA	–Adjuvante completo de Freund
CGRP	–Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
DHODH	–Enzima humana dihidroorotato desidrogenase
DMARD	–Anti-reumáticos modificadores do curso da doença
FR	–Fator reumatoide
HAQ	–Questionário de avaliação em saúde (Health Assessment Questionnaire)
HLA-DR	–É um receptor da superfície celular de MHC codificadas pelo complexo antigénio leucocitário humano

IFD	–Flexão das interfalanganias distais
IFP	–Flexão das articulações interfalanganias proximais
IL-1	–Interleucina 1
IL-6	–Interleucina 6
IL-17	–Interleucina 17
IFN- $\gamma$	–Interferon gama
LFD	–Leflunomida
LPS	–Lipopolissacarídeos bacterianos
MCF	–Articulações metacarpofalangeais
MTF	–Hiperextensão das articulações metatarsofalanganias
RX	–Radiografias simples
TNF $\alpha$	–Fator de necrose tumoral alfa
Treg	–Células T regulatórias
TRP	–Receptores de potencial transitório
TRPA1	–Receptor de Potencial Transitório Anquirina 1
NST	–Pacientes artríticos não tratados com terapia específica

## LISTA DE SÍMBOLOS

Mg	–Miligrama
ml	–Microlitros
IU	–Unidades internacionais
$\mu\text{g/ml}$	–Microgramas por mililitros
U/ml	–Unidades por mililitros
$\mu\text{M}$	–Micromolar
pH	–Potencial hidrogeniônico
M	–Molar

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Características gerais da Artrite Reumatoide</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Participação do sistema imune na fisiopatologia da artrite reumatoide</b> .....	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Terapêutica da artrite reumatoide</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4</b>	<b>Nocicepção</b> .....	<b>28</b>
<b>2.5</b>	<b>O Sistema neuronal, os receptores TRP, e sua importância na artrite reumatoide</b> .....	<b>30</b>
<b>2.6</b>	<b>O receptor TRPA1 e seu potencial imunomodulador</b> .....	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>LISTA DE PUBLICAÇÕES</b> .....	<b>51</b>
	<b>ANEXO I (Artigo publicado)</b> .....	<b>53</b>
	<b>ANEXO II (Artigo submetido)</b> .....	<b>64</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A artrite reumatoide (AR) é uma doença auto-imune que frequentemente está associada com incapacidade progressiva, complicações sistêmicas, morte precoce e impacto socioeconômico. A causa da artrite reumatoide é desconhecida, e o prognóstico é impreciso. Muitos avanços aconteceram no entendimento da patogênese da doença, porém, a falta de resposta ao tratamento em muitos pacientes têm estimulado o desenvolvimento de novas pesquisas em busca de novas perspectivas terapêuticas. No Brasil, estima-se que a prevalência mundial da AR seja de 1% a 3%, afetando mais mulheres do que homens, com uma incidência maior na faixa etária entre 30 e 50 anos.

Além das alterações articulares da AR, as quais englobam dor e inflamação crônica com dano e perda da função articular; uma série de complicações clínicas extra-articulares podem se desenvolver nos pacientes, acometendo a pele, coração, pulmões, sistema nervoso, olhos e o sistema hematopoiético; causando danos consideráveis ao seu portador e subsequente diminuição da expectativa de vida. Dentre estas alterações sistêmicas, destaca-se a anemia, a qual está associada ao aumento da deficiência física e da mortalidade da doença.

Diversos mecanismos associados à doença têm sido identificados, incluindo alterações imunológicas e sensoriais, os quais contribuem para a progressão da doença, dor e disfunção observadas em pacientes com AR. A elucidação destes mecanismos tem contribuído para uma evolução na terapêutica da doença, entretanto, diversos pacientes continuam irresponsivos à terapia disponível no mercado para o tratamento da dor e alterações intra-articulares; além de continuarem também irresponsivos ao tratamento das alterações extra-articulares da doença como a artrite reumatóide.

Dentre as vias recentemente identificadas na progressão da AR, encontra-se o receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1), expresso em células neuronais e não neuronais. Evidências obtidas de modelos animais de AR e dor inflamatória têm sugerido a participação destes receptores na progressão das alterações articulares doença. Ainda, dados do nosso laboratório recentemente demonstraram que a ativação do TRPA1 modula a resposta imune mediada por macrófagos, células estas que contribuem efetivamente para a destruição articular, sugerindo que este receptor pode contribuir para as alterações imunes características da AR.

Assim, avaliou-se as correlações da expressão deste receptor em leucócitos periféricos com a dor, disfunção articular e alterações imunes observadas em pacientes com

AR tratados ou não com terapia anti-reumática, em comparação à indivíduos saudáveis. Avaliou-se também o impacto da terapia com drogas anti-reumáticas na anemia associada à AR.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Características gerais da Artrite Reumatóide**

A artrite reumatoide é uma doença autoimune caracterizada por um processo inflamatório recorrente e destrutivo que afeta as estruturas articulares, levando eventualmente à destruição progressiva de ossos e articulações. A patologia é caracterizada por um distúrbio imunoregulatório, com predominância de células inflamatórias e tolerância periférica defeituosa. Estes eventos imunopatológicos ocorrem predominantemente dentro das articulações e particularmente dentro da membrana sinovial como o principal local de ação de células mononucleares (MORADI et al., 2014).

A doença está associada à destruição progressiva das articulações e, dependendo da gravidade, pode ser acompanhada de manifestações sistêmicas, incluindo efeitos sobre o sangue, em particular, a anemia que é uma manifestação muito comum na inflamação reumatoide que pode aumentar a atividade da AR e diminuir a qualidade de vida do paciente (SMYRNOVA GANNA, 2014)

A exacerbação dos sintomas radiológicos inicia na fase aguda, mas se agrava principalmente, em estágios mais avançados da doença com a redução dos espaços articulares provocados pela inflamação, erosão óssea e pela sinovite, que é um dos achados mais comuns na artrite reumatoide. Esses sintomas são agravados pelo stress mecânico e os ossos afetados, uma vez destruídos, não são mais totalmente reparados mesmo após o tratamento (KOH et al., 2015).

Sem tratamento adequado, o curso da doença é progressivo, determinando deformidades decorrentes da lassidão ou ruptura dos tendões e das erosões articulares. Os achados tardios, incluem desvio ulnar dos dedos ou “dedos em ventania”; deformidades em “pescoço de cisne” (hiperextensão das articulações interfalangianas proximais e flexão das interfalangianas distais - IFD); deformidades em “botoeira” (flexão das articulações interfalangianas proximais (IFP) e hiperextensão das IFD); “mãos em dorso de camelo” (aumento de volume do punho e das articulações metacarpofalangeais (MCF) com atrofia

interóssea dorsal); joelhos valgos (desvio medial); tornozelos valgos (eversão da articulação subtalar), hálux valgo (desvio lateral do hálux); “dedos em martelo” (hiperextensão das articulações metatarsofalangianas (MTF) e extensão das IFD), “dedos em crista de galo” (deslocamento dorsal das falanges proximais com exposição da cabeça dos metatarsianos) e pés planos (arco longitudinal achatado) (VENABLES; MAINI, 2012).

Segundo Marques et al. (2015), a incapacidade funcional na artrite reumatoide tem característica multidimensional e esta associada à diversos fatores, como, por exemplo, dor, limitação na mobilidade articular, destruição de cartilagem articular, diminuição da força muscular, duração da doença, atividade da doença, além de comorbidades, sendo assim, pode ter variações nos aspectos que influenciem no nível de incapacitação.

Michaud et al. (2012), demonstraram que a idade acima de 65 anos, o tempo de doença e a presença de comorbidades são os principais fatores preditores de perda da capacidade funcional (incapacitância) na artrite reumatoide; e que esses fatores exercem um maior efeito na progressão do escore mensurado pelo Questionário de Avaliação da Saúde (HAQ) do que o tratamento com biológicos. Sendo assim, diferentes estágios da doença, podem ter impactos diferentes no nível de incapacidade dos pacientes.

A artrite reumatoide é uma doença debilitante tanto fisicamente, quanto emocionalmente. A destruição progressiva das articulações, muitas vezes leva grandes deficiências e essas deficiências limitam severamente a qualidade de vida e as atividades sociais. O impacto da artrite reumatoide nas atividades de trabalho é um problema significativo, com efeitos profundos sobre o doente e sobre a sociedade. As limitações físicas e emocionais impostas pela doença podem afetar as atividades do paciente em casa e no trabalho, levando à impactos no convívio familiar, redução do desempenho no trabalho e nas atividades sociais (TAMBORENEA et al., 2015).

O processo inflamatório está diretamente relacionado à progressão da artrite reumatoide. Embora a inflamação ocorra de forma intensa nas articulações, diversas alterações tanto na ativação de células quanto na produção de mediadores inflamatórios, são observadas sistemicamente e podem ser detectadas no sangue periférico. A angiogênese, a partir de vasos pré-existentes, desempenha um papel crítico na patogênese da artrite reumatoide, pois a migração excessiva de leucócitos circulantes na articulação inflamada exige formação de novos vasos sanguíneos para fornecer nutrientes e oxigênio para a articulação hipertrófica (ELSHABRAWY et al., 2015).

## 2.2 Participação do sistema imune na fisiopatologia da artrite reumatoide

Muitos fatores têm sido associados à artrite reumatoide, tais como fumo, doenças brônquicas, agentes infecciosos (por exemplo, vírus de Epstein-Barr, citomegalovírus, espécies de *Proteus*, e *Escherichia coli*), embora os mecanismos permaneçam ainda desconhecidos (AUGER; ROUDIER, 1997; SYMMONS et al., 1997; KAMPHUIS et al., 2005). Além disso, a artrite reumatoide parece estar associada à doenças periodontais provocadas por *Porphyromonas gingivalis*, microorganismo capaz de promover citrulinização de proteínas e finalmente, o microbioma gastrointestinal que agora é reconhecido por influenciar o desenvolvimento de auto-imunidade (SCHER et al., 2010; WEGNER et al., 2010).

A artrite reumatoide resulta na quebra de tolerância imunológica, com surgimento de linfócitos T auto reativos ou redução de linfócitos T supressores, ou ainda devido a um desequilíbrio entre os linfócitos T efetores e células T regulatórias, que por algum defeito, se mostram incapazes de bloquear a ação de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , sintetizados por linfócitos T e monócitos. O FNT $\alpha$  desempenha um papel chave nos eventos patológicos associados a artrite reumatoide e as células T Regulatórias (TReg) nestes pacientes, parecem ser incapazes de suprimir a ação dessa citocina, e portanto, este é um importante alvo terapêutico, bem estabelecido. Os agentes anti-TNF $\alpha$  revolucionaram o tratamento da artrite reumatoide resistente aos anti-reumáticos modificadores do curso da doença (DMARDs), porém diferentes tipos de anti-TNF $\alpha$  agem de forma diferente sobre células TReg (BLACHE et al., 2011).

Herrath et al. (2011) demonstraram que o ambiente inflamatório na artrite reumatoide reduz a capacidade das células Treg em lidar com o grande número de células inflamatórias, favorecendo a hipótese de que a atividade supressiva de linfócitos Treg pode ser alterada ou contrabalanceada por linfócitos T ativados, nas articulações que são menos suscetíveis a supressão.

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> são um subconjunto de células T que estão envolvidas tanto na tolerância imunológica periférica, como na supressão de linfócitos T auto-reativos. O seu papel nas doenças auto-imunes, nas quais a quebra de tolerância, é de particular interesse para determinar os mecanismos de progressão da doença (WANG et al., 2015). O estabelecimento do CD127 como um marcador de superfície adicional, em

combinação com CD25, tem sido usado para facilitar a identificação quantitativa de células TReg viáveis, uma vez que células CD24CD25<sup>high</sup>CD127<sup>Low</sup> /- são altamente positivas para Fox P3 (MORADI et al., 2014).

Os linfócitos B desempenham um papel chave na fisiopatologia da artrite reumatoide, participam do processo inflamatório pela apresentação de antígenos, pela produção de auto-anticorpos e pela síntese de citocinas. O dano articular é aumentado com o influxo de sangue e com a ativação de células mononucleares (CHOY, 2012). A migração celular é iniciada após a ativação endotelial, o que aumenta o número de microvasos sinoviais (neoangiogênese), e também a expressão de moléculas de adesão, incluindo integrinas, selectinas e membros da superfamília das imunoglobulinas) e de quimiocinas (SZEKANECZ et al., 2009). Uma variedade de células efetoras, incluindo macrófagos, mastócitos e células assassinas naturais, é encontrada na membrana sinovial, enquanto que os neutrófilos residem principalmente no fluido sinovial. Em particular, macrófagos são efetores centrais de sinovite (CORNISH et al., 2009).

Oitenta a 90% dos leucócitos que se infiltram na sinóvia, são neutrófilos. O papel específico dos neutrófilos no início da doença não está claro, mas há evidências de que participam do dano articular e na progressão da sinovite, pela síntese de prostaglandinas, proteases, espécies reativas de oxigênio, liberação de enzimas proteolíticas, citocinas, pela fagocitose (PAOLIELLO-PASCHOALATO et al., 2015).

A inflamação do tecido sinovial de múltiplas articulações, leva a destruição tecidual, dor, deformidade e diminuição da qualidade de vida do paciente. Estas alterações resultam da ação de linfócitos T e B autorreativos que causam uma sinovite, e assim, a membrana sinovial passa a ser fonte de citocinas pró-inflamatórias e proteases, as quais promovem destruição articular (GOELDNER et al., 2011).

Embora a inflamação afete principalmente as articulações sinoviais, a artrite reumatoide é uma doença sistêmica, e linfócitos Th1 e Th17 estão fortemente implicados na patogênese da doença (ANNUNZIATO et al., 2009). A função das células T regulatórias (Treg) prejudicada contribui para o aumento do número de linfócitos TCD4<sup>+</sup>, assim como no aumento da produção de TNF- $\alpha$ , de IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-1 e IL-6 na membrana sinovial (NIE et al., 2013). Sendo assim, os linfócitos TCD4<sup>+</sup> recrutados para o interior da membrana sinovial, junto com monócitos e outras células, medeiam a síntese de várias citocinas inflamatórias, importantes na patogênese da doença (MORADI et al., 2014).

As citocinas pró-inflamatórias contribuem para a quimiotaxia e ativação de macrófagos, sinoviócitos, condrócitos e osteoclastos; que além de estimular a proliferação de

outras células inflamatórias, promovem ainda, erosão óssea, e deformidade articular (BLACHE et al., 2015). O TNF- $\alpha$  estimula ainda, células endoteliais a expressarem moléculas de adesão, o que atrai mais leucócitos para articulações afetadas, e aumenta a síntese de metaloproteinases e inibindo a síntese de proteoglicanos na cartilagem (WEINBLLAT et al., 2003).

O aumento da expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6, e IL-17 está intimamente associado à gravidade da artrite reumatoide, portanto, a inibição destas citocinas, especialmente de TNF- $\alpha$  é uma estratégia para o tratamento da doença, pois o TNF- $\alpha$  está no topo da cascata inflamatória, sendo o responsável pela ativação de linfócitos, estimulação da liberação de enzimas proteolíticas pelos macrófagos, produção de outras citocinas inflamatórias como IL-6 e IL-13. Seu papel fundamental no processo inflamatório, resulta na reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos, assim como na sinovite, o que faz com que o bloqueio de TNF- $\alpha$  seja apontado como opção para reduzir a destruição articular (PING WEI ZHAO et al. 2014; CRUVINEL et al., 2008).

Chará et al. (2015) relataram em um estudo, que os monócitos inflamatórios tem um papel fundamental na doença que está relacionado com sua capacidade de migrar do sangue para os tecidos inflamados, onde diferenciam-se em diferentes células efetoras, tais como macrófagos, células dendríticas e osteoclastos, que são fenotipicamente diferentes e possuem atividades funcionalmente heterogêneas.

O HLA-DR (antígenos leucocitários humanos) é um receptor de monócitos e macrófagos do complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC II), e a expressão do HLA-DR está associada à maior proliferação celular e também à produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a uma ativação do sistema imune. As células que expressam HLA-DR na sua superfície estão ativamente envolvidas em doenças com imunorregulação desordenada, incluindo a artrite reumatoide. Entre os pacientes, o locus de HLA-DRB1, está associado à maior susceptibilidade à doença, à gravidade radiológica, à mortalidade e à resposta ao tratamento (VIATTE et al., 2015).

As moléculas sintetizadas no decurso da inflamação, como peróxido de hidrogênio, derivados do ácido araquidônico podem ativar as vias de sinalização inflamatória, tais como proteína cinase A e fosfolipase C capazes de sensibilizar e ativar receptores de potencial transitório (TRP) relacionados à nocicepção e, portanto à transmissão da sensação dolorosa (MOILANEN et al., 2015).

### 2.3 Terapêutica da artrite reumatoide

Em virtude do grande número de pessoas com artrite no mundo todo, existe hoje, um grande investimento na pesquisa de mecanismos patofisiológicos associados à artrite. Atualmente estão disponíveis uma série de tratamentos locais e sistêmicos para artrite reumatoide, especialmente para o tratamento da dor e das alterações imunes relacionadas a esta doença. Os tratamentos mais comuns incluem anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), os quais aliviam a dor e em alguns casos, a inflamação da articulação, mas não alteram a progressão da doença, porém possuem diversos efeitos colaterais associados aos tratamentos empregados. Na tentativa de reduzi-los, tratamentos combinados de drogas em dosagens reduzidas têm sido empregados. Além disso, o emprego em estágios iniciais da doença de agentes anti-reumáticos modificadores do curso da doença (DMARD), como Hidroxicloroquina, Sulfassalazina, Leflunomida, Azatioprina e Ciclosporina vêm sendo utilizados especialmente em combinação com outras drogas da mesma classe ou ainda em combinação com agentes anti-inflamatórios não-esteroidais no controle da progressão da doença e também para a minimização dos danos (COLMEGNA et al., 2012).

Um dos DMARDs mais utilizados na clínica é a Leflunomida, cujo metabólito A771726 é conhecido por bloquear a proliferação de células T pela inibição da dihidro-orotato desidrogenase que bloqueia a síntese de pirimidina (Fragoso e Brooks, 2015) e por reduzir a expressão de moléculas de adesão sobre células mononucleares de sangue periférico e sua migração para a sinovia inflamada (Grisar Et al., 2004).

O arsenal terapêutico para a artrite reumatoide continua a se expandir, e novas drogas eficazes tem sido continuamente incorporadas ao tratamento desta doença. As possibilidades de controle da progressão da doença e destruição das articulações tem aumentado muito com a utilização dos DMARDs e também com a recente inclusão dos medicamentos biológicos ou anticorpos monoclonais (CHARA et al., 2015).

O uso de agentes biológicos (anticorpos para citocinas, ou outros componentes inflamatórios) no tratamento da artrite vem crescendo bastante; sendo efetivos especialmente quando agentes modificadores da doença e anti-inflamatórios são inefetivos e com efeitos colaterais reduzidos, mas ao mesmo tempo, são de custo elevado (COLMEGNA et al., 2012).

Os anticorpos monoclonais passaram por uma jornada evolutiva ao longo dos últimos 25 anos, com os avanços da biologia molecular, desenvolvimento de processos e

formulação de drogas que sustentam a sua ascensão, tornaram uma das classes mais eficazes e economicamente importantes de agentes terapêuticos. O sucesso de anticorpos para o tratamento da artrite reumatoide tem impulsionado a indústria biofarmacêutica a otimizar em todos os aspectos, a descoberta de mais anticorpos terapêuticos, de modo a fornecer benefícios adicionais aos pacientes, por meio de maior eficácia clínica e conveniência ao paciente (LOWE; VAUGHAN, 2015).

As drogas anti-TNF como Adalimumab, Etanercept e Infliximab, foram os primeiros agentes biológicos para manejo de pacientes com artrite reumatoide que não respondiam aos medicamentos tradicionais não-biológicos como os anti-reumáticos modificadores do curso da doença (DMARDs). No entanto, o TNF desempenha um papel importante na defesa do hospedeiro, e conseqüentemente, a introdução de agentes anti-TNF induzem imunossupressão, por isso há necessidade de se avaliar e entender o efeito desta droga sobre diversos riscos (BENUCCI et al., 2012).

A terapia com anti-TNF está associada com reativação de tuberculose latente (SALLIOT; DOUGADOS; GOSSEC, 2009), e também com maior risco de desenvolver linfomas e câncer de pulmão (SMITTEN et al., 2008), uma vez que os alvos moleculares de terapia biológica podem ser importantes na vigilância de tumores. (BARNABÉ; MARTIN; GHALI, 2011; WESTLAKE et al., 2011).

Adalimumab é um anticorpo monoclonal, inibidor do fator de necrose tumoral  $\alpha$  humano (TNF  $\alpha$ ), que liga-se especificamente ao TNF e neutraliza a função biológica desta citocina, bloqueando a sua interação com os receptores p55 e p75 do TNF de superfície celular, modulando assim as respostas biológicas induzidas ou reguladas pelo TNF, incluindo as alterações dos níveis das moléculas de adesão responsáveis pela migração leucocitária (ELAM-1, VCAM-1 e ICAM-1) redução dos níveis de marcadores de inflamação de fase aguda (PCR e VHS) e de citocinas inflamatórias como IL-6, promovendo melhorias no controle e progressão da doença (MALOTTKI et al. 2011) .

Apesar da eficácia dos agentes biológicos, os doentes podem interromper tratamento por uma variedade de razões, incluindo falta de eficácia, perda de resposta ao tratamento, eventos adversos, decisão pessoal e por remissão (BLUM; KOO; DOSHI, 2011). Além disso, as respostas ao tratamento da artrite reumatoide muitas vezes não são duráveis, o que leva a frequentes trocas de tratamentos, sendo importante a busca de novos agentes, que também melhorem outras características da artrite, tais como fadiga, deficiência da

capacidade funcional e dor, assim também, existe a necessidade de identificação de biomarcadores preditivos para determinar qual a droga mais eficaz, segura, e durável num dado indivíduo (POPE; COMBE, 2013).

Além disso, é necessário entender os fatores que levam à perda de tolerância e que causa a localização da inflamação especificamente nas articulações. É necessário encontrar maneiras de controlar a resposta imunológica ou a homeostasia e ainda a reparação de articulações danificadas. Finalmente é preciso elucidar os mecanismos que acionam os vários distúrbios sistêmicos que contribuem substancialmente para a redução na qualidade e duração de vida (MCINNES; SCHETT, 2011).

A remissão clínica tornou-se uma meta de tratamento para garantir maior qualidade de vida, melhor função física e capacidade de trabalho, no entanto, é apenas o primeiro objetivo importante em uma abordagem de tratamento, uma vez que a manutenção da remissão é ainda um desafio no tratamento da doença, assim como redução da dor, das incapacidades e da mortalidade associada à doença (RADNER et al., 2015).

Apesar dos avanços na descoberta de fármacos, ainda não há cura para a artrite reumatoide ou medicamento que possa eliminar a doença permanentemente e eliminar completamente a dor (ROY; KANWAR; KANWAR, 2015). A dor é uma característica persistente dos pacientes com artrite e continua a ser uma das grandes reclamações dos pacientes sob os tratamentos disponíveis no mercado farmacêutico. Assim, existe uma necessidade constante de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos capazes de promover o tratamento adequado e barrar a progressão da doença e da dor.

## **2.4 Nocicepção**

A dor é um mecanismo de autodefesa fundamental que serve para alertar contra danos, e é importante para tomadas de medidas com a finalidade de evitar e minimizar a lesão. De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como "Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial " (ABBRACCHIO e REGGIANI, 2013). Já o termo nocicepção deve ser entendido como os processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos, e pode se estabelecer sem que ocorra dor ou vice-versa, mas geralmente aparece associado à patologias dolorosas (LOESER; TREEDE, 2008). A capacidade de detectar estes estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo. Porém,

mesmo que a dor normalmente funcione como uma resposta de alerta aos indivíduos, ela pode se tornar um sintoma debilitante, como ocorre na dor crônica (WOOLF, 2010).

A dor pode causar uma redução drástica na qualidade de vida dos pacientes e levar a implicações em diversos níveis como psicológico e emocional (podendo aumentar a incidência de doenças psiquiátricas como a depressão), social (diminuindo a capacidade de trabalho e podendo levar ao desemprego), fisiológico (causando o desenvolvimento de dor crônica e o aumento das complicações pós-operatórias), e também econômico (levando a redução da força de trabalho e aumento dos gastos com serviços de saúde e medicamentos). Dessa maneira, o tratamento efetivo da dor deve ser considerado como uma prioridade, principalmente em doenças associadas a dor crônica (BRENNAN; CARR; COUSINS, 2007; COUSINS; LYNCH, 2011; KING; FRASER, 2013; LOHMAN; SCHLEIFER; AMON, 2010)

Os nociceptores são terminações periféricas livres de axônios oriundos de neurônios sensoriais nociceptivos, estes neurônios possuem o seu corpo celular nos gânglios do trigêmio (GT) para a face, nos gânglios da raiz dorsal (GRD) para o corpo, e nos gânglios nodoso (GN) e vagal (GV) para as vísceras. Sendo neurônios pseudo-unipolares os neurônios nociceptivos possuem terminações centrais (medula espinhal e tronco cerebral) e também periféricas (tecido onde possui inervações), e então são capazes de detectar a informação na periferia e transmitir a estruturas centrais. Os neurônios sensoriais envolvidos na transmissão de estímulos nociceptivos podem ser classificados em duas classes principais e apresentam diferenças quanto à velocidade de condução, quanto à expressão na membrana e também quanto à categoria de estímulo nocivo conduzido, sendo que as fibras A $\delta$  são formadas por neurônios mielinizados de médio diâmetro, e as fibras C são representadas por neurônios de pequeno diâmetro e não mielinizados (BASBAUM et al., 2009; LOESER; TREEDE, 2008; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010; WOOLF, 2010).

A transmissão de um determinado estímulo nocivo depende da sua capacidade de gerar um potencial de ação quando da ativação de um nociceptor na periferia, este é então conduzido até o corno dorsal da medula espinhal (sobretudo as lâminas I, II e V), onde então ocorre a liberação de neurotransmissores excitatórios, principalmente substância P (SP) e glutamato. Após a ocorrência deste processo é possível que uma resposta reflexa ao estímulo nocivo seja gerada, e desta forma o local afetado será afastado da fonte de estímulo, esta ação é gerada pela ativação de um neurônio motor reflexo. Porém, para que este sinal seja transmitido até centros supra-espinhais é necessário que um neurônio de segunda ordem

sensorial (como neurônios de projeção e interneurônios) seja ativado e então estes sinais nocivos serão prontamente discriminados e reconhecidos como dolorosos.

Diferente da dor nociceptiva, uma segunda forma de dor, denominada dor inflamatória, é também adaptativa e tem função de proteger o organismo, porém neste caso a sensibilidade sensorial é aumentada após o dano aos tecidos de maneira a auxiliar a recuperação do local lesado. Dessa forma, os pacientes relatam a sensação de dor a estímulos antes descritos como inócuos (dor a estímulos não nociceptivos denominada alodínia), ou o aparecimento de hiperalgesia que é considerada como a percepção exacerbada da dor a estímulos anteriormente descritos como dolorosos, além da ocorrência de dor espontânea (LOESER; TREEDE, 2008; WOOLF, 2010). A dor inflamatória é causada pela ativação do sistema imune após lesão tecidual ou infecção. Esta forma de dor é de fato uma das características principais da inflamação. Mesmo que esta dor seja adaptativa, ainda deve ser reduzida em pacientes com inflamação recorrente, como no caso de pacientes com artrite inflamatória, e em casos de lesão extensa ou grave (CHANDRATRE et al., 2013; LINDSAY et al., 2011; WOOLF, 2010).

Enquanto a dor nociceptiva é um processo agudo que desencadeia respostas apropriadas para a proteção do organismo, e normalmente persiste apenas até a resolução da lesão; a dor crônica ocorre quando a dor tende a continuar após a resolução da lesão ou prossegue devido à modificação dos mecanismos envolvidos na modulação da dor (WOOLF, 2010).

Na dor crônica associada à dor inflamatória pode-se observar o aparecimento de hipersensibilidade a estímulos dolorosos e inócuos e também dor espontânea, estes sintomas clínicos são causados pela modificação dos mecanismos usuais da transmissão dos estímulos nociceptivos. Sendo que estes sintomas podem ser vinculados a mecanismos moleculares periféricos ou centrais e estes estão associados ao processo denominado como sensibilização. Neste caso, a ocorrência deste fenômeno pode causar um aumento na resposta de neurônios nociceptivos a estímulos supra-limiáres, ou ainda, resposta a estímulos abaixo do limiar de ativação destes. E podem, também, ocorrer descargas espontâneas e aumento do campo receptivo dos nociceptores (BASBAUM et al., 2009; LOESER; TREEDE, 2008; OSSIPOV; DUSSOR; PORRECA, 2010; WOOLF, 2010).

## **2.5 O Sistema neuronal, os Receptores de Potencial Transitório (TRP) e sua importância na artrite reumatoide**

A inflamação é uma resposta biológica normal à lesão do tecido neuronal que ativa uma resposta imunológica. A liberação de mediadores inflamatórios ativam as células neuronais e não neuronais como as células do sistema imunológico que infiltram o tecido danificado. Assim, os neurônios sensoriais desempenham papel importante na montagem de uma resposta inflamatória (BAUTISTA; PELLEGRINO; TSUNOZAKI, 2013).

Os neurônios sensoriais também participam de vários eventos patofisiológicos incluindo o desenvolvimento neuronal e fetal, manutenção da homeostase, percepção da dor e progressão de diferentes doenças como artrite, colite, asma, dentre outras. A ampla distribuição destes neurônios, associada com a habilidade de liberar mediadores quando estimulados, fazem destas células, peças únicas necessárias a modulação de respostas teciduais e celulares, conectando os sistemas nervoso central e periférico (ALAWI; KEEBLE, 2010; FERNANDES et al., 2012).

Diversos receptores encontram-se expressos no tecido neuronal, incluindo receptores do tipo Toll-like (OCHOA-CORTES et al., 2010), Receptores para leucotrienos (ANDOH; KURASHI, 2005), receptores para neuropeptídeos (HOLZER, 1991; MAGGI, 1991; ANDOH et al., 1996; BRAIN; COX, 2006), receptores para complemento (JANG et al., 2010), receptores para prostaglandinas (DURRENBERGER et al., 2006), dentre outros; demonstrando assim o grande potencial da participação dos neurônios sensoriais em doenças inflamatórias. Os receptores TRP encontram-se expressos nas fibras sensoriais do tipo C e A $\delta$  e quando estimulados, promovem a liberação dos neuropeptídeos substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (Calcitonin Gene-Related Peptide; CGRP), importantes na sensação dolorosa e inflamação contínua presentes na artrite reumatoide (TAKEBA et al., 1999; KEEBLE; BRAIN, 2004).

Durante a inflamação, vários mediadores incluindo ATP, adenosina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, histamina e várias citocinas ativam neurônios sensoriais aferentes primários que liberam neuropeptídeos inflamatórios, tais como a substância P, neuroquinina A, e peptídeo relacionado ao gene calcitonina. Estes neuropeptídeos promovem o extravasamento de proteínas do plasma, vasodilatação, acúmulo de neutrófilos e hipersensibilidade a estímulos mecânicos térmicos e químicos (BASBAUM et al., 2009).

A família de receptores TRP é uma família de canais iônicos TRP que engloba mais de 30 membros, que inclui entre outros TRPV, TRPM, TRPC, TRPN, TRPML, TRPP e

o TRPA. (FERNANDES et al., 2012). O receptor de potencial transitório anquirina 1 (TRPA1) é o único membro do subgrupo TRPA que é caracterizado por um grande número de repetições de anquirina no domínio N-terminal. Ele é permeável a cátions, particularmente ao  $\text{Ca}^{+2}$  e pode ser ativado por uma variedade de irritantes químicos que incluem Isotiocianato de alilo (óleo de mostarda), alicina, gingerol, cinamaldeído, eugenol e metilsalicilato (MCGARAHUGHLY et al., 2010) e também por diversos agonistas endógenos, incluindo mudanças na temperatura, espécies reativas de oxigênio, produtos oxidados e outros mediadores inflamatórios (ANDERSSON et al., 2009; FERNANDES et al., 2012; VAY et al., 2012) frequentemente gerados na artrite reumatoide (LIN et al., 2011; XIE et al., 2012).

Como os demais TRPs, o TRPA 1 também é expresso em neurônios sensoriais e em células não-neuronais, como células endoteliais (EARLEY et al., 2009) e sinoviócitos humanos (KOCHUKOV et al., 2006). A expressão de TRPA1 em sinoviócitos e em células endoteliais é funcional, isto é; induz o influxo de cálcio, quando estimulada (KOCHUKOV et al., 2006; EARLEY et al., 2009) sugerindo que este receptor pode ser um importante mediador da inflamação e dor nas articulações.

O TRPA1 é também um alvo de agentes inflamatórios endógenos e durante o processo inflamatório, espécies reativas de oxigênio (ROS), são liberadas pelas células em resposta ao dano tecidual e podem provocar peroxidação dos lípideos, o que resulta na formação de espécies reativos tal como o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e 4-oxononenal (4-one), provocando um estresse nitrativo, o que pode ativar o TRPA1 (TREVISANI et al., 2007; TAYLOR-CLARK et al., 2008, 2009, CORDERO-MORALES; GRACHEVA; JULIUS, 2011).

Com a geração recente de camundongos com deleção gênica para o receptor TRPA1 (TRPA1KO) e de antagonistas seletivos para este receptor, o papel do TRPA1 vem sendo estudado na artrite reumatoide. Em 2007, Petrus e colaboradores publicaram as primeiras evidências de que o tratamento com um antagonista seletivo para o TRPA1 era efetivo contra a dor de origem inflamatória. Outro estudo de Eid et al. (2008) também demonstrou que a inibição farmacológica de TRPA1 reduz significativamente a alodinia e hiperalgesia, e animais com deficiência de TRPA1 não exibem sensibilização. Esses dados foram obtidos em camundongos tratados com o antagonista AP-18, agente que aboliu a hiperalgesia mecânica causada pela injeção do adjuvante completo de Freund (Complete Freund's adjuvant; CFA). Em estudo similar de Petrus et al. (2007) demonstraram que camundongos TRPA1KO artríticos apresentavam hiperalgesia mecânica, 24h após a injeção CFA.

Recentemente foi demonstrado no modelo de hiperalgesia mecânica bilateral induzida pelo TNF $\alpha$ , que a administração intratecal e intraplantar com AP-18, causava analgesia (FERNANDES et al., 2011), sugerindo um importante papel para o TRPA1 tanto a nível central quanto periférico, na dor inflamatória. O mesmo estudo demonstrou ainda, que animais TRPA1KO apresentavam analgesia quando injetados com TNF $\alpha$  intraplantar ou CFA intrarticular no joelho, em comparação a animais WT. De forma interessante, camundongos TRPA1KO apresentaram analgesia somente a partir da segunda semana após a indução da artrite pelo CFA (FERNANDES ES et al., 2011).

Similarmente, em estudos realizados em ratos, o tratamento oral com outro antagonista seletivo TRPA1, o HC-030031, reduziu a hiperalgesia mecânica causada pelo CFA (EID et al., 2008). Além disso, o tratamento sistêmico com o antagonista seletivo TRPA1 A-967079 reduziu a atividade neuronal após a estimulação dolorosa mecânica em ratos injetados intraplantarmente com CFA (MCGARAUGHTY et al., 2010). Interessante notar que há aumento da expressão de TRPA1 em neurônios de pequeno e médio diâmetro presentes no gânglio da raiz dorsal em animais tratados intraplantarmente com CFA (OBATA et al., 2005).

Embora existam evidências experimentais em modelos animais, de que o TRPA1 é um importante modulador da dor de origem inflamatória, característica da artrite reumatoide, o uso de antagonistas seletivos para o tratamento da dor inflamatória em humanos, permanece por ser investigado. Além disso, o estudo do receptor TRPA1 ainda é uma área de pesquisa relativamente nova, especialmente no que diz respeito das vias envolvidas na participação deste receptor na artrite reumatoide. Desta forma, a identificação dos ativadores endógenos do TRPA1 que contribuem para a evolução da dor e inflamação associadas à artrite reumatoide, assim como estudos sobre o papel do TRPA1 nesta patologia, são de extrema importância.

## **2.6 O receptor TRPA1 e seu potencial imunomodulador**

Na maioria das espécies, incluindo humanos, o receptor de potencial transiente anquirina 1 (TRPA1) funciona principalmente como um sensor químico, expresso em tecidos neuronais e não neuronais. Assim a compreensão do potencial farmacológico e das possibilidades de modulação deste receptor oferece perspectivas importantes no tratamento de diversas doenças que cursam com a dor (GOMTSYAN; SZALLASI, 2015).

Estudos genéticos em animais e humanos mostram que alterações nas funções dos canais TRP podem levar a uma variedade de doenças, como a síndrome de dor hereditária (MORAN et al., 2011).

Desde a identificação dos primeiros canais TRP, eles tem sido estudados, como potenciais alvos para drogas, porém, apesar de diversas evidências de que distúrbios no funcionamento destes canais podem estar relacionados à gama de doenças, apenas 4 das aproximadamente 28 subunidades de canais TRP de mamíferos, tem sido explorados para se chegar a novas drogas. Várias evidências atribuem aos canais TRP papel na regulação das funções cutâneas, homeostase, controle do crescimento, sobrevivência celular, processos imunes e inflamatórios, o que os torna alvos importantes para o desenvolvimento de vários medicamentos (HOLZER; IZZO, 2014).

Embora os estudos que relatem envolvimento destes receptores na regulação da resposta imune sejam poucos, um papel immunosupressor tem sido sugerido tanto para seus agonistas endógenos quanto exógenos. O cinamaldeído é um óleo essencial extraído de plantas do gênero *Cinnamomum*, e é considerado um agonista exógeno do TRPA1. Em 1998, Koh e colaboradores demonstraram que o cinamaldeído, é capaz de alterar a resposta imune *in vitro*. O cinamaldeído causou aumento da diferenciação de linfócitos em CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. O derivado do cinamaldeído (2'-hidroxi cinamaldeído) inibiu a produção de NO, de espécies reativas de oxigênio e a ativação do NF-κB em macrófagos tratados com LPS (LEE et al., 2005; CHAO et al., 2008). Além disso, o cinamaldeído inibiu a liberação de IL-1β and TNFα por macrófagos humanos e monócitos THP-1 estimulados com LPS (CHAO et al., 2008).

Da mesma forma, o efeito immunosupressor foi sugerido para os agonistas endógenos do TRPA1. A incubação de 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), um produto de peroxidação lipídica (UCHIDA, 2003); com monócitos humanos inibiu a diferenciação destas células, em células dendríticas (SKOROKHOD et al., 2005). 4-HNE também causou redução da ativação do NF-κB em monócitos humanos THP-1 na presença de *Chlamydia pneumonia*, e preveniu a produção de citocinas *in vitro* (TNFα, IL-1β, IL-6 e IL-8) por monócitos e macrófagos humanos tratados com LPS, assim como a fagocitose mediada por macrófagos (HAMILTON JR. et al., 1996; PAGE et al., 1999; DONATAH et al., 2002; KIM et al., 2009). A 15d-PGJ<sub>2</sub>, outro agonista endógeno do TRPA1, é capaz de inibir a migração de neutrófilos induzida pelo tratamento com LPS em camundongos (ALVES et al., 2011) e de reduzir a produção de TNFα, CCL2 e CXCL6 à partir de células endoteliais bovinas tratadas com LPS (LUTZOW et al., 2008).

Embora estes dados obtidos de estudos com os agonistas TRPA1 sugiram uma propriedade imunossupressora para este receptor, não se sabe ao certo qual o papel relativo do TRPA1 na resposta imune desencadeada na artrite reumatoide. Também não se sabe até que ponto esta imunossupressão seria benéfica no prognóstico da artrite reumatoide. Sendo assim, entender o papel do TRPA1 na modulação da resposta imune envolvida na artrite reumatoide é ainda um desafio na compreensão da fisiopatologia da doença.

### 3. REFERÊNCIAS

ADLOWITZ, D. G., BARNARD, J., BIEAR, J. N., CISTRONE, C., OWEN, T., WANG, W., LOONEY, R. J. Expansion of activated peripheral blood memory B cells in rheumatoid arthritis, impact of B cell depletion therapy, and biomarkers of response. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0128269, 2015.

ABBRACCHIO, Maria P.; REGGIANI, Angelo M. Pain and nociception. In: **Neurosciences-From Molecule to Behavior: a university textbook**. Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 445-459.

ALAWI, Khadija; KEEBLE, Julie. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation. **Pharmacology & therapeutics**, v. 125, n. 2, p. 181-195, 2010.

ALVES, C. F., DE MELO, N. F. S., FRACETO, L. F., DE ARAUJO, D. R., NAPIMOGA, M. H. Effects of 15d-PGJ<sub>2</sub> -loaded poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanocapsules on inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 162, p. 623-632, 2011.

ANDERSON, J., CAPLAN, L., YAZDANY, J., ROBBINS, M. L., NEOGI, T., MICHAUD, K., KAZI, S. Rheumatoid arthritis disease activity measures: American College of Rheumatology recommendations for use in clinical practice. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 64, p. 640-647, 2012.

ANDERSSON, D. A., GENTRY, C., MOSS, S., BEVAN, S. Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. **The journal of neuroscience**, v. 28, n. 10, p. 2485-2494, 2008.

ANDOH, T., NAGASAWA, T., & KURAIISHI, Y. Expression of tachykinin NK1 receptor mRNA in dorsal root ganglia of the mouse. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 35, p. 329-332, 1996.

ANDOH, T.; KURAIISHI, Y. Expression of BLT1 leukotriene B4 receptor on the dorsal root ganglion neurons in mice. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 137, p. 263-266, 2005.

ANDRADE, E. L.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology & therapeutics**, v. 133, n. 2, p. 189-204, 2012.

ANNUNZIATO, F., COSMI, L., LIOTTA, F., MAGGI, E., ROMAGNANI, S. Type 17T helper cells – origins, features and possible roles in rheumatic disease. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 5, p. 325-331, 2009.

ARAVENA, O., PESCE, B., SOTO, L., ORREGO, N., SABUGO, F., WURMANN, P., CATALÁN, D. Anti-TNF therapy in patients with rheumatoid arthritis decreases Th1 and Th17 cell populations and expands IFN- $\gamma$ -producing NK cell and regulatory T cell subsets. **Immunobiology**, v. 216, n. 12, p. 1256-1263, Dec 2011.

ARNETT, F. C., EDWORTHY, S. M., BLOCH, D. A., MCSHANE, D. J., FRIES, J. F., COOPER, N. S., MEDSGER, T. A. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 31, n. 3, p. 315-324, 1988.

AUGER, I.; ROUDIER, J. A function for the QKRAA amino acid motif: mediating binding of DnaJ to DnaK: implications for the association of rheumatoid arthritis with HLA-DR4. **J Clin Invest**, v. 99, p. 1818-1822, 1997.

BALCI, M. A., PAMUK, Ö. N., PAMUK, G. E., UZUNDERE, F. K., DONMEZ, S. Epidemiology and outcome of adult-onset Still's disease in Northwestern Thrace region in Turkey. **Clin Exp Rheumatol**, 31 Aug 2015.

BANG, SANGSU; HWANG, SUN WOOK. Polymodal ligand sensitivity of TRPA1 and its modes of interactions. **The Journal of general physiology**, v. 133, n. 3, p. 257-262, 2009.

BARALDI, P. G., PRETI, D., MATERAZZI, S., & GEPPETTI, P. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 14, p. 5085-5107, 2010.

BARNABE, C.; MARTIN B. J.; GHALI, W. A. Systematic Review and Meta-Analysis: Anti-Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Therapy and Cardiovascular Events in Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Care Res**, v. 63, n. 4, p. 522-529, 2011.

BASBAUM, A. I., BAUTISTA, D. M., SCHERRER, G., JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

BAUTISTA, D. M.; PELLEGRINO, M.; TSUNOZAKI, M. TRPA1: A Gatekeeper for Inflammation. **Annu Rev Physiol**, v. 75, p. 181-200, 2013.

BENUCCI, M. Determinantes do perigo de infecção durante o tratamento com anti TNF- $\alpha$  bloqueadores em Artrite Reumatoide. **Open Rheumatol J**, v. 6, p. 33-37, 2012.

Brennan, F., Carr, D. B., & Cousins, M. Pain management: a fundamental human right. **Anesthesia & Analgesia**, v. 105, n. 1, p. 205-221, 2007.

BESSAC, B. F., SIVULA, M., VON HEHN, C. A., ESCALERA, J., COHN, L., JORDT, S. E. TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. **The Journal of clinical investigation**, v. 118, n. 5, p. 1899-1910, 2008.

BINIECKA, M., KENNEDY, A., NG, C. T., CHANG, T. C., BALOGH, E., FOX, E., O'SULLIVAN, J. N. Successful tumour necrosis factor (TNF) blocking therapy suppresses oxidative stress and hypoxia-induced mitochondrial mutagenesis in inflammatory arthritis. **Arthritis research & therapy**, v. 13, n. 4, p. 1, 2011.

BLACHE, C., LEQUERRÉ, T., ROUCHEUX, A., BEUTHEU, S., DEDREUX, I., JACQUOT, S., VITTECOQ, O. Number and phenotype of rheumatoid arthritis patients' CD4+CD25hi regulatory T cells are not affected by adalimumab or etanercept. **Rheumatology**, v. 50, p. 1814-1822, 2011.

BLUM, M. A.; KOO, D.; DOSHI, J. A. Measurement and Rates of Persistence with and Adherence to Biologics for Rheumatoid Arthritis. **Clinical Therapeutics**, v. 33, n. 7, p. 901-913, 2011.

BRAIN, S. D.; COX, H. M. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. **Br J Pharmacol**, v. 147, Suppl 1, p. S202-S211, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Portaria nº 710, de 27 de junho de 2013**. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Artrite Reumatoide. Brasília: MS, 2013.

BUENDGENS, F. B., BLATT, C. R., MARASCIULO, A. C. E., LEITE, S. N., FARIAS, M. R. Estudo de custo-análise do tratamento da artrite reumatoide grave em um município do Sul do Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 29, suppl.1, p. s81-s91, 2013.

CACCIAPAGLIA, F., ANELLI, M. G., RIZZO, D., MORELLI, E., SCIOSCIA, C., MAZZOTTA, D., LAPADULA, G. Influence of TNF- $\alpha$  inhibition on oxidative stress of rheumatoid arthritis patients. **Reumatismo**, v. 67, n. 3, p. 97-102, 2016.

Cigarette smoke-induced neurogenic inflammation is mediated by alpha CAMPI, B., MATERAZZI, S., TREVISANI, M., AMADESI, S., MASSI, D., CREMINON, C., POOLE, D., beta-unsaturated aldehydes and the TRPA1 receptor in rodents. **Journal of Clinical Investigation [P]**, v. 118, n. 7, p. 2574-2582, 2008.

CARVALHEIRO, H., ANTUNES, D., DUARTE, C., SILVA-CARDOSO, S., RODRIGUES-SOUSA, T., DA SILVA, J. A., SOUTO-CARNEIRO, M. M. Characterisation of CD8+ T cell subsets in the synovial fluid and peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. **Ann Rheum Dis**, v. 70, p. A46, 2011.

CARVALHEIRO, H., DUARTE, C., SILVA- CARDOSO, S., DA SILVA, J. A., SOUTO- CARNEIRO, M. M. CD8 + T cell profiles in patients with rheumatoid arthritis and their relationship to disease activity. **Arthritis Rheumatol**, v. 67, n. 2, p. 363-371, Feb 2015.

CATALÁ, ANGEL. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chemistry and physics of lipids**, v. 157, n. 1, p. 1-11, 2009.

CHAO, L. K., HUA, K. F., HSU, H. Y., CHENG, S. S., LIN, I. F., CHEN, C. J., CHANG, S. T. Cinnamaldehyde inhibits pro-inflammatory cytokines secretion from monocytes/macrophages through suppression of intracellular signaling. **Food Chem Toxicol**, v. 46, p. 220-231, 2008.

CHANDRATRE, P., RODDY, E., CLARSON, L., RICHARDSON, J., HIDER, S. L., & MALLIN, C. D. Health-related quality of life in gout: a systematic review. **Rheumatology**, p. ket265, 2013.

CHARA, L., SÁNCHEZ-ATRIO, A., PÉREZ, A., CUENDE, E., ALBARRÁN, F., TURRIÓN, A., PRIETO, A. The number of circulating monocytes as biomarkers of the clinical response to methotrexate in untreated patients with rheumatoid arthritis. **J Transl Med**, v. 13, n. 2, 16 Jan 2015

CHEN, Y. G., LUI, H. M., LIN, S. L., LEE, J. M., YING, S. Y. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by activin. **Experimental Biology and Medicine**, v. 227, n. 2, p. 75-87, 2002.

CHIU, I. M.; HEHN, C. A.; WOOLF, C. J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. **Nature Neuroscience**, v. 15, p. 1063-1067, 2012.

CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Rheumatology**, v. 51, Suppl 5, p. v3-v11, 2012.

COLMEGNA, I., OHATA, B. R., MENARD, H. A. Current understanding of rheumatoid arthritis therapy. **Clin Pharmacol Ther**, v. 91, p. 607-20, 2012.

COMAR, J. F., DE SÁ-NAKANISHI, A. B., DE OLIVEIRA, A. L., WENDT, M. M. N., AMADO, C. A. B., IWAMOTO, E. L. I., BRACHT, A. Oxidative state of the liver of rats with adjuvant-induced arthritis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 58, p. 144-153, 2013.

CORBACHO, M. I.; DAPUETO, J. J. Avaliação da capacidade funcional e da qualidade de vida de pacientes com artrite reumatoide. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 1, p. 31-43, 2010.

CORDERO-MORALES, J. F.; GRACHEVA, E. O.; JULIUS, D. Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 108, p. E1184-E1191, 2011.

CORNISH, A. L., CAMPBELL, I. K., MCKENZIE, B. S., CHATFIELD, S., WICKS, I. P. G-CSF and GM-CSF as the Yellin therapeutic targets in rheumatoid arthritis. **Nat Rev Rheumatol**, v. 5, p. 554-559, 2009.

COSTA, J. D. O., ALMEIDA, A. M., GUERRA JUNIOR, A. A., CHERCHIGLIA, M. L., ANDRADE, E. I. G., ACURCIO, F. D. A. Tratamento da artrite reumatoide no Sistema Único de Saúde, Brasil: gastos com infliximabe em comparação com medicamentos modificadores do curso da doença sintéticos, 2003 a 2006. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 2, p. 283-295, fev. 2014.

CRAWLEY, E., KAY, R., SILLIBOURNE, J., PATEL, P., HUTCHINSON, I., WOO, P. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 42, n. 6, p. 1101-1108, 1999.

CRUVINEL, W. M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, JAP. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse de**, 2008.

DATTA, S., KUNDU, S., GHOSH, P., DE, S., GHOSH, A., CHATTERJEE, M. Correlation of oxidant status with oxidative tissue damage in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical rheumatology**, v. 33, n. 11, p. 1557-1564, 2014.

DE ALMEIDA, D. E., LING, S., PI, X., HARTMANN-SCRUGGS, A. M., PUMPENS, P., HOLOSHITZ, J. Immune dysregulation by the rheumatoid arthritis shared epitope. **J Immunol**, v. 185, p. 1927-1934, 2010.

DONATH, B., FISCHER, C., PAGE, S., PREBECK, S., JILG, N., WEBER, M., BRAND, K. Chlamydia pneumoniae activates IKK/I kappa B-mediated signaling, which is inhibited by 4-HNE and following primary exposure. **Atherosclerosis**, v. 165, n. 1, p. 79-88, 2002.

DONG, Fei; HE, Xijing. Activin A: a potential therapeutic target for characterizing and stopping joint pain early in rheumatoid arthritis patients. **Inflammation**, v. 37, n. 1, p. 170-176, 2014.

DURRENBERGER, P. F., FACER, P., CASULA, M. A., YIANGOU, Y., GRAY, R. A., CHESSELL, I. P., ELLIOT, D. Prostanoid receptor EP1 and Cox-2 in injured human nerves and a rat model of nerve injury: a time-course study. **BMC Neurol**, v. 6, p. 1, 2006.

EARLEY, S., GONZALES, A. L., CRNICH, R. Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by TRPA1 and Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> channels. **Circ Res**, v. 104, p. 987-994, 2009.

EHRENSTEIN, M. R., EVANS, J. G., SINGH, A., MOORE, S., WARNES, G., ISENBERG, D. A., & MAURI, C. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. **J Exp Med**, v. 200, p. 27785, 2004.

EID, S. R., CROWN, E. D., MOORE, E. L., LIANG, H. A., CHOONG, K. C., DIMA, S., URBAN, M. O. HC-030031, a TRPA1 selective antagonist, attenuates inflammatory- and neuropathy-induced mechanical hypersensitivity. **Mol Pain**, v. 4, p. 48, 2008.

ELSHABRAWY, H. A., CHEN, Z., VOLIN, M. V., RAVELLA, S., VIRUPANNAVAR, S., SHAHRARA, S. The pathogenic role of angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Angiogenesis**, 22 Jul 2015.

EMERY, P., KEYSTONE, E., TONY, H. P., CANTAGREL, A., VAN VOLLENHOVEN, R., SANCHEZ, A., KREMER, J. IL-6 receptor inhibition with tocilizumab improves treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis refractory to anti-tumour necrosis factor biologicals: results from a 24-week multicentre randomised placebo-controlled trial. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 67, n. 11, p. 1516-1523, 2008.

FERNANDES, E. D. Á., CASTRO JUNIOR, M. R. D., MITRAUD, S. D. A. V., KUBOTA, E. S., FERNANDES, A. D. R. C. Ultrasonography in Rheumatoid Arthritis: Applicability and Expectations. **Rev Bras Reumatol**, v. 48, n.1, p. 25-30, 2008.

FERNANDES, E. S., FERNANDES, M. A., KEEBLE, J. E. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. **Br J Pharmacol**, v. 166, p. 510-521, 2012.

FERNANDES, E. S., RUSSELL, F. A., SPINA, D., MCDOUGALL, J. J., GRAEPEL, R., GENTRY, C., BEVAN, S. A Distinct Role for Transient Receptor Potential Ankyrin 1, in Addition to Transient Receptor Potential Vanilloid 1, in Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Induced Inflammatory Hyperalgesia and Freund's Complete Adjuvant-Induced Monarthritis. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n. 3, p. 819-829, Mar. 2011.

FERNANDES, E. S., RUSSELL, F. A., SPINA, D., MCDOUGALL, J. J., GRAEPEL, R., GENTRY, C., BEVAN, S. A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monarthritis. **Arthritis Rheum**, v. 63, p. 819-829, 2011.

FIRESTEIN, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. **Nature**, v. 423, p. 356-361, 2003.

FISCHER, J. A., HUEBER, A. J., WILSON, S., GALM, M., BAUM, W., KITSON, C., TISSOT, A. C. Combined inhibition of TNF $\alpha$  and IL-17 as therapeutic opportunity for treatment in rheumatoid arthritis: Development and characterization of a novel bispecific antibody. **Arthritis Rheumatol.(Hoboken, NJ)**, v. 67, p. 51-62, 2014.

GANNA, S. The prevalence of anemia in rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 54, n. 4, p. 257-259, Jul/Aug 2014.

GOELDNER, I., SKARE, T. L., DE MESSIAS REASON, I. T., NISIHARA, R. M., SILVA, M. B., DA ROSA UTIYAMA, S. R. Association of anticyclic citrullinated peptide antibodies with extra-articular manifestations, gender, and tabagism in rheumatoid arthritis patients from southern Brazil. **Clin Rheumatol**, v. 30, p. 975-980, 2011.

GOMTSYAN, A.; SZALLASI, A. Targeting TRP channels: beyond TRPV1. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 388, p. 387-388, 2015.

GRATZKE, C., STRENG, T., WALDKIRCH, E., SIGL, K., STIEF, C., ANDERSSON, K. E., HEDLUND, P. Transient receptor potential A1 (TRPA1) activity in the human urethra--evidence for a functional role for TRPA1 in the outflow region. **Eur Urol**, v. 55, n. 3, p. 696-704, Mar 2009.

GRIBI, R., TANAKA, T., HARPER-SUMMERS, R., YU, J. Expression of activin A in inflammatory arthropathies. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 180, n. 1, p. 163-167, 2001.

HAMILTON JR, R. F., HAZBUN, M. E., JUMPER, C. A., ESCHENBACHER, W. L., HOLIAN, A. 4-Hydroxynonenal mimics ozone-induced modulation of macrophage function ex vivo. **Am J Respir Cell Mol Biol**, v. 15, p. 275-282, 1996.

HAN, C., RAHMAN, M. U., DOYLE, M. K., BATHON, J. M., SMOLEN, J., KAVANAUGH, A., BALA, M. Association of anemia and physical disability among patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**, v. 34, p. 2177-2182, 2007.

HASHIMOTO, M., FUJII, T., HAMAGUCHI, M., FURU, M., ITO, H., TERAQ, C., OHMURA, K. Increase of Hemoglobin Levels by Anti-IL-6 Receptor Antibody (Tocilizumab) in Rheumatoid Arthritis. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e98202, 2014.

HAUFE, S., HAUG, M., SCHEPP, C. Impaired Suppression of Synovial Fluid CD4+ CD25- T Cells From Patients With Juvenile Idiopathic Arthritis by CD4+CD25+ Treg Cells. **Arthritis & Rheumatism**, v. 63, n.10, p. 3153-3162, Oct 2011.

HERRATH, J., MÜLLER, M., AMOUDRUZ, P., JANSON, P., MICHAËLSSON, J., LARSSON, P. T., MALMSTRÖM, V. The inflammatory milieu in the rheumatic joint reduces regulatory T-cell function. **Eur Immunol**, v. 41, p. 2279-2290, 2011.

HOLZER, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. **Adv Exp Med Biol**, v. 298, p. 3-16, 1991.

HOLZER, P.; IZZO, A. A. The pharmacology of TRP channels. **Br J Pharmacol**, v. 171, n. 10, p. 2469-2473, May 2014.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860-867, 2006.

HÜBNER, G., BRAUCHLE, M., GREGOR, M., & WERNER, S. Activin A: a novel player and inflammatory marker in inflammatory bowel disease?. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 77, n. 4, p. 311-318, 1997.

HUSSAIN, W., JANOUDI, N., NOORWALI, A., OMRAN, N., BAAMER, M., ASSIRY, E. H., MIGNUET, J. Effect of Adalimumab on Work Ability Assessed in Rheumatoid Arthritis Disease Patients in Saudi Arabia (AWARDS). **Open Rheumatol J**, v. 10, n. 9, p. 46-50, 10 Jul 2015.

IRMLER, INGO M.; GAJDA, MIECZYSLAW; BRÄUER, ROLF. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN- $\gamma$ -deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 9, p. 6228-6236, 2007.

JAHNS, R. Evaluation of pannus and vascularization of the metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints in rheumatoid arthritis by High-Resolution Ultrasound (Multidimensional Linear Array). **Arthritis Rheum**, v. 42, p. 2303-2308, 1999.

JANG, J. H., CLARK, J. D., LI, X., YOREK, M. S., USACHEV, Y. M., & BRENNAN, T. J. Nociceptive sensitization by complement C5a and C3a in mouse. **Pain**, v. 148, p. 343-352, 2010.

JONES, R. L., SALAMONSEN, L. A., CRITCHLEY, H. O. D., ROGERS, P. A. W., AFFANDI, B., FINDLAY, J. K. Inhibin and activin subunits are differentially expressed in endometrial cells and leukocytes during the menstrual cycle, in early pregnancy and in women using progestin-only contraception. **Molecular human reproduction**, v. 6, n. 12, p. 1107-1117, 2000.

KAGEYAMA, Y., TAKAHASHI, M., ICHIKAWA, T., TORIKAI, E., NAGANO, A. Reduction of oxidative stress marker levels by anti-TNF-alpha antibody, infliximab, in patients with rheumatoid arthritis. **Clinical and experimental rheumatology**, v. 26, n. 1, p. 73, 2008.

KAMPHUIS, S., KUIS, W., DE JAGER, W., TEKLENBURG, G., MASSA, M., GORDON, G., SETTE, A. Tolerogenic immune responses to novel T-cell epitopes from heat-shock protein 60 in juvenile idiopathic arthritis. **Lancet**, v. 366, p. 50-56, 2005.

KATAYAMA, M., OHMURA, K., YUKAWA, N., TERAOKA, C., HASHIMOTO, M., YOSHIFUJI, H., MIMORI, T. Neutrophils are essential as a source of IL-17 in the effector phase of arthritis. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e62231, 2013.

KEEBLE, J. E., BODKIN, J. V., LIANG, L., WODARSKI, R., DAVIES, M., FERNANDES, E. S., MALCANGIO, M. Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms. **PAIN**, v. 141, n. 1, p. 135-142, 2009.

KEEBLE, J. E.; BRAIN, S. D. A role for substance P in arthritis?. **Neurosci Lett**, v. 361, n. 1-3, p. 176-179, 6 May 2004.

KEEN, H. I.; EMERY, P. How should we manage early rheumatoid arthritis? From imaging to intervention. **Curr Opin Rheumatol**, v. 17, n. 3, p. 280-285, 2005.

KIM, Y. S., PARK, Z. Y., KIM, S. Y., JEONG, E., LEE, J. Y. Alteration of Toll-like receptor 4 activation by 4-hydroxy-2-nonenal mediated by the suppression of receptor homodimerization. **Chem Biol Interact**, v. 182, p. 59-66, 2009.

KOCHUKOV, M. Y., MCNEARNEY, T. A., FU, Y., WESTLUND, K. N. Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 291, p. C424-C432, 2006.

KOH, J. H., JUNG, S. M., LEE, J. J., KANG, K. Y., KWOK, S. K., PARK, S. H., JU, J. H. Radiographic Structural Damage Is Worse in the Dominant than the Non-Dominant Hand in Individuals with Early Rheumatoid Arthritis. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0135409, 2015.

KOH, W. S., YOON, S. Y., KWON, B. M., JEONG, T. C., NAM, K. S., & HAN, M. Y. Cinnamaldehyde inhibits lymphocyte proliferation and modulates T-cell differentiation. **Int J Immunopharmacol**, v. 20, p. 643-660, 1998.

KOKO, V.; NDREPEPA, A.; SKENDERAJ, S. Epidemiology of Rheumatoid Arthritis in Southern Albania. **Mater Sociomed**, v. 27, n. 3, p. 172-175, Jun 2015.

KOSMACZEWSKA, A., CISZAK, L., SWIERKOT, J., SZTEBLICH, A., WILAND, P., & FRYDECKA, I. Alterations in Both the Activatory and Inhibitory Potential of Peripheral Blood CD4+ T Cells in Rheumatoid Arthritis Patients Correlate with Disease Progression. **Pathol Oncol Res**, v. 20, n. 2, p. 235-243, 2014.

KOTAKE, S., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., MATSUZAKI, K., ITOH, K., ISHIYAMA, S., MARTIN, T. J. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid

arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 103, n. 9, p. 1345-1352, 1999.

LAURINDO, I. M. M., XIMENES, A. C., LIMA, F. A. C., PINHEIRO, G. R. C., BATISTELLA, L. R., BERTOLO, M. B., RADOMINSKI, S. C. Artrite reumatoide: diagnóstico e tratamento. **Rev Bras Reumatol**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 435-442, nov./dez. 2004.

LEE, S. H., LEE, S. Y., SON, D. J., LEE, H., YOO, H. S., SONG, S., HONG, J. T. Inhibitory effect of 2'-hydroxycinnamaldehyde on nitric oxide production through inhibition of NF- $\kappa$ B activation in RAW 264.7 cells. **Biochem Pharmacol**, v. 69, p. 791-799, 2005.

LI, N., MA, T., HAN, J., ZHOU, J., WANG, J., ZHANG, J., & ZHENG, S. Increased apoptosis induction in CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells contributes to enhanced disease activity in patients with rheumatoid arthritis through IL-10 regulation. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 18, n. 1, p. 78-85, 2014.

LIN, T. H., TANG C. H., WU K., FONG Y. C., YANG R. S., FU, W. M. 15-deoxy- $\Delta$  (12,14)-prostaglandin-J2 and ciglitazone inhibit TNF- $\alpha$ -induced matrix metalloproteinase 13 production via the antagonism of NF- $\kappa$ B activation in human synovial fibroblasts. **J Cell Physiol**, v. 226, p. 3242-3250, 2011.

LINDQVIST, E., JONSSON, K., SAXNE, T., EBERHARDT, K. Course of radiographic damage over 10 years in a cohort with early rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis**, v. 62, n. 7, p. 611-616, 2003.

Lindsay, K., Gow, P., Vanderpyl, J., & Dalbeth, N. The experience and impact of living with gout: a study of men with chronic gout using a qualitative grounded theory approach. **JCR: Journal of Clinical Rheumatology**, v. 17, n. 1, p. 1-6, 2011.

LOUZADA-JUNIOR, P., SOUZA, B. D. B., TOLEDO, R. A., CICONELLI, R. M. Análise descritiva das características demográficas e clínicas de pacientes com artrite reumatoide no estado de São Paulo, Brasil. **Rev Bras Reumatol**, v. 47, n. 2, p. 84-90, mar./abr. 2007.

LOWE, D. C.; VAUGHAN, T. J. Rheumatology: A Force for Change in Monoclonal Antibodies. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 17, p. 2179-2186, May 2015.

LÜBBERS, J., BRINK, M., VAN DE STADT, L. A., VOSSLAMBER, S., WESSELING, J. G., VAN SCHAARDENBURG, D., VERWEIJ, C. L. The type I IFN signature as a biomarker of preclinical rheumatoid arthritis. **Annals of the rheumatic diseases**, v. 72, n. 5, p. 776-780, 2013.

LUISI, S., FLORIO, P., REIS, F. M., PETRAGLIA, F. Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications. **European Journal of Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 225-236, 2001.

LUTZOW, Y. S., GRAY, C., TELLAM, R. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 induces chemokine expression, oxidative stress and microfilament reorganization in bovine mammary epithelial cells. **J Dairy Res**, v. 75, p. 55-63, 2008.

MAGGI, C. A. The pharmacology of the efferent function of sensory nerves. **J Auton Pharmacol**, v. 11, p. 173-208, 1991.

MALDONADO, A., MUELLER, Y. M., THOMAS, P., BOJCZUK, P., O'CONNORS, C., KATSIKIS, P. D. Decreased effector memory CD45RA+CD62L<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cells and increased central memory CD45RA<sup>-</sup>CD62L<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood of rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Res Ther**, v. 5, p. R91-R96, 2003.

MALOTTKI K, BARTON P, TSOURAPAS A, UTHMAN AO, LIU Z, ROUTH K, ET AL. Adalimumab, etanercept, infliximab, rituximab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis after the failure of a tumour necrosis factor inhibitor: A systematic review and economic evaluation. *Health Technology Assessment*. 2011;15(14):1300.

MARQUES, W. V., CRUZ, V. A., REGO, J., DA SILVA, N. A. The impact of comorbidities on the physical function in patients with rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 208, 2015.

MATEEN, S., MOIN, S., KHAN, A. Q., ZAFAR, A., FATIMA, N. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. **PLoS one**, v. 11, n. 4, p. e0152925, 2016.

MATSUSE, T., IKEGAMI, A., OHGA, E., HOSOI, T., OKA, T., KIDA, K., FUKUCHI, Y. Expression of immunoreactive activin A protein in remodeling lesions associated with interstitial pulmonary fibrosis. **The American journal of pathology**, v. 148, n. 3, p. 707, 1996.

MCGARAUGHTY, S., CHU, K. L., PERNER, R. J., DIDOMENICO, S., KORT, M. E., KYM, P. R. TRPA1 modulation of spontaneous and mechanically evoked firing of spinal neurons in uninjured, osteoarthritic, and inflamed rats. **Mol Pain**, v. 6, p. 14, 2010.

MCINNES, I. B.; SCHETT, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. **New Engl J Med**, v. 365, p. 2205-2219, 2011.

MICHAUD, K; VERA-LLONCH M; OSTER G. Mortality risk by functional status and health-related quality of life in patients with rheumatoid arthritis. **J Rheumatol**. 2012 Jan;39(1):54-9. doi: 10.3899/jrheum.110491. Epub 2011 Nov 15.

MOILANEN, L. J., HÄMÄLÄINEN, M., LEHTIMÄKI, L., NIEMINEN, R. M., MOILANEN, E. Urate Crystal Induced Inflammation and Joint Pain Are Reduced in Transient Receptor Potential Ankyrin1 Deficient Mice – Potential Role for Transient Receptor Potential Ankyrin 1 in Gout. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117770, 2015.

MORADI, B., SCHNATZER, P., HAGMANN, S., ROSSHIRT, N., GOTTERBARM, T., KRETZER, J. P., TRETTER, T. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>/highCD127<sup>low</sup>/-regulatory T cells are enriched in rheumatoid arthritis and osteoarthritis joints - analysis of frequency and phenotype in synovial membrane, synovial fluid and peripheral blood. **Arthritis Res Ther**, v. 16, n. 2, p. R97, 2014.

- MORAN, M. M., MCALEXANDER, M. A., BÍRÓ, T., SZALLASI, A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 601-620, Aug 2011.
- MORITA, Y., YAMAMURA, M., KAWASHIMA, M., HARADA, S., TSUJI, K., SHIBUYA, K., MAKINO, H. Flow cytometric single-cell analysis of cytokine production by CD4+ T cells in synovial tissue and peripheral blood from patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 41, n. 9, p. 1669-1676, Sep 1998.
- MORVA, A., LEMOINE, S., ACHOUR, A., PERS, J. O., YOUINOU, P., JAMIN, C. Maturation and function of human dendritic cells are regulated by B lymphocytes; Leading the way in experimental and clinical research in hematology. **Blood**, v. 119, n.1, p. 106-114, 5 Jan 2012.
- MOTA, L. M. H. D., LAURINDO, I. M. M., NETO, S. General principles for treatment of early rheumatoid arthritis. **Rev Assoc Med Bras**, v. 56, p. 360-362, 2010b.
- MOTA, L. M. H. D., LAURINDO, I. M. M., SANTOS NETO, L. L. D., LIMA, F. A. C., VIANA, S. L., MENDLOVITZ, P. S., FERNANDES, J. L. Diagnóstico por imagem da artrite reumatoide inicial. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 5, p. 757-766, 2012.
- MOTA, L. M. H. D., NETO, S., PEREIRA, I. A., BURLINGAME, R., MÉNARD, H. A., & LAURINDO, I. M. M. Autoantibodies in early rheumatoid arthritis: Brasilia cohort: results of a three-year serial analysis. **Rev Bras Reumatol**, v. 51, n. 6, p. 564-571, Dec 2011.
- MOTA, L. M. H. D., SANTOS NETO, L. L. D., BURLINGAME, R., MÉNARD, H. A., LAURINDO, I. M. M. Características laboratoriais de um grupo de pacientes com artrite reumatoide inicial. **Rev Bras Reumatol**, v. 50, n. 4, p. 375-388, 2010a.
- NADKARNI, S.; MAURI, C.; EHRENSTEIN, M. R. Anti-TNF- $\alpha$  therapy induces a distinct regulatory T cell population in patients with rheumatoid arthritis via TGF- $\beta$ . **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 1, p. 33-39, 22 Jan 2007.
- NAKAE, S., SAIJO, S., HORAI, R., SUDO, K., MORI, S., & IWAKURA, Y. IL-17 production from activated T cells is required for the spontaneous development of destructive arthritis in mice deficient in IL-1 receptor antagonist. Proceedings of the National **Academy of Sciences**, v. 100, n. 10, p. 5986-5990, 2003.
- NAKOU, M., KATSIKAS, G., SIDIROPOULOS, P., BERTSIAS, G., PAPADIMITRAKI, E., RAPTOPOULOU, A., BOUMPAS, D. T. Rituximab therapy reduces activated B cells in both the peripheral blood and bone marrow of patients with rheumatoid arthritis: depletion of memory B cells correlates with clinical response. **Arthritis Res Ther**, v. 11, p. R131, 2009.
- NIE, H., ZHENG, Y., LI, R., GUO, T. B., HE, D., FANG, L., CHIN, Y. E. Affiliations Contributions, Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF- $\alpha$  in rheumatoid arthritis. **Nature Medicine**, v. 19, p. 322-328, 2013.
- NILIUS, BERND; APPENDINO, GIOVANNI; OWSIANIK, GRZEGORZ. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 464, n. 5, p. 425-458, 2012.

O'DONNELL, S., RUSU, C., HAWKER, G. A., BERNATSKY, S., MCRAE, L., CANIZARES, M., BADLEY, E. M. Arthritis has an impact on the daily lives of Canadians young and old: results from a population-based survey. **BMC Musculoskelet Disord**, v. 16, n. 1, p. 230, 30 Aug 2015.

OBATA, K., KATSURA, H., MIZUSHIMA, T., YAMANAKA, H., KOBAYASHI, K., DAI, Y., NOGUCHI, K. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. **J Clin Invest**, v. 115, p. 2393-2401, 2005.

OCHOA-CORTES, F., RAMOS-LOMAS, T., MIRANDA-MORALES, M., SPREADBURY, I., IBEAKANMA, C., BARAJAS-LOPEZ, C., VANNER, S. Bacterial cell products signal to mouse colonic nociceptive dorsal root ganglia neurons. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 299, p. G723-G732, 2010.

OLIVEIRA, B. M. G. B. D., MEDEIROS, M. M. D. C., CERQUEIRA, J. V. M. D., QUIXADÁ, R. T. D. S., OLIVEIRA, Í. M. A. X. D. Metabolic syndrome in patients with rheumatoid arthritis followed at a university hospital in Northeastern Brazil. **Rev Bras Reumatol**, n. 233, 12 Aug. 2015.

PAOLIELLO-PASCHOALATO, A. B., MARCHI, L. F., ANDRADE, M. F. D., KABEYA, L. M., DONADI, E. A., LUCISANO-VALIM, Y. M. Fcγ and Complement Receptors and Complement Proteins in Neutrophil Activation in Rheumatoid Arthritis: Contribution to Pathogenesis and Progression and Modulation by Natural Products. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2015, p. 429878, 2015.

PETRUS, M., PEIER, A. M., BANDELL, M., HWANG, S. W., HUYNH, T., OLNEY, N., PATAPOUTIAN, A. A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. **Mol Pain**, v. 3, p. 40, 2007.

PINTO, L. G., TALBOT, J., PERES, R. S., FRANCA, R. F., FERREIRA, S. H., RYFFEL, B., CUNHA, F. Q. Joint production of IL-22 participates in the initial phase of antigen-induced arthritis through IL-1β production. **Arthritis Res Ther**, v. 17, n. 1, p. 235, 2 Sep 2015.

POPE, J.; COMBE, B. Unmet Needs in the Treatment of Rheumatoid Arthritis. **Open J Rheumatol Autoimmune Diseases**, v. 3, n. 2, p. 65-78, 2013.

RADNER, H., ALASTI, F., SMOLEN, J. S., ALETAHA, D. Physical function continues to improve when clinical remission is sustained in rheumatoid arthritis patients. **Arthritis Res Ther**, v. 17, p. 203, 11 Aug 2015.

RANTAPÄÄ- DAHLQVIST, S., DE JONG, B. A., BERGLIN, E., HALLMANS, G., WADELL, G., STENLUND, H., VAN VENROOIJ, W. J. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 48, p. 2741-2749, 2003.

RINDFLEISCH, A.; MULLER, D. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis. **Am Fam Physician**, v. 72, p. 1037-1047, 2005.

ROCHA, V. M.; PIPPA, M. G. B. Evaluation of Risk Factors for Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis. **ATBV**, Sep 2015.

ROY, K.; KANWAR, R. K.; KANWAR, J. R. Molecular targets in arthritis and recent trends in nanotherapy. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 5407-5420, 26 Aug 2015.

SALLIOT, C.; DOUGADOS, M.; GOSSEC, L. Risk of Serious Infections during Rituximab, Abatacept and Anakinra Treatments for Rheumatoid Arthritis: Meta-Analyses of Randomised Placebo-Controlled Trials. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 68, n. 1, p. 25-32, 2009.

SAWADA, Y., HOSOKAWA, H., MATSUMURA, K., & KOBAYASHI, S. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 5, p. 1131-1142, 2008.

SCHELLEKENS, G. A., VISSER, H., DE JONG, B. A., VAN DEN HOOGEN, F. H., HAZES, J. M., BREEDVELD, F. C., VAN VENROOIJ, W. J. The diagnostic properties of rheumatoid arthritis antibodies recognizing a cyclic citrullinated peptide. **Arthritis & Rheumatism**, v. 43, n. 1, p. 155-163, 2000.

SCHER, J. U., UBEDA, C., PILLINGER, M. H., BRETZ, W., BUISCHI, Y., ROSENTHAL, P. B. Characteristic oral and intestinal microbiota in rheumatoid arthritis (RA): a trigger for autoimmunity? **Arthritis Rheum**, v. 62, Suppl 1390, 2010.

SHAO, L. E., FRIGON JR, N. L., YU, A., PALYASH, J., YU, J. Contrasting effects of inflammatory cytokines and glucocorticoids on the production of activin a in human marrow stromal cells and their implications. **Cytokine**, v. 10, n. 3, p. 227-235, 1998.

SKAPENKO, A., LEIPE, J., LIPSKY, P. E., SCHULZE-KOOPS, H. The role of the T cell in autoimmune inflammation. **Arthritis Res Ther**, v. 7, Jan/Mar 2005.

SKOROKHOD, O., SCHWARZER, E., GRUNE, T., ARESE, P. Role of 4-hydroxynonenal in the hemozoin-mediated inhibition of differentiation of human monocytes to dendritic cells induced by GM-CSF/IL-4. **Biofactors**, v. 24, p. 283-289, 2005.

SMITTEN, A. L., SIMON, T. A., HOCHBERG, M. C., SUISSA, S. A Meta-Analysis of the Incidence of Malignancy in Adult Patients with Rheumatoid Arthritis. **Arthritis Res Ther**, v. 10, n. 2, p. R45, 2008.

SMYRNOVA, G. The relationship between hemoglobin level and disease activity in patients with rheumatoid arthritis. **Rev Bras Reumatol**, v. 54, n. 6, p. 437-440, Nov/Dec 2014.

SOLER PALACIOS, B., ESTRADA- CAPETILLO, L., IZQUIERDO, E., CRIADO, G., NIETO, C., MUNICIO, C., PUIG- KRÖGER, A. Macrophages from the synovium of active rheumatoid arthritis exhibit an activin A- dependent pro- inflammatory profile. **The Journal of pathology**, v. 235, n. 3, p. 515-526, 2015.

SOMMER, O. J., KLADOSEK, A., WEILER, V., CZEMBIREK, H., BOECK, M., STISKAL, M. Rheumatoid arthritis: a practical guide to state-of-art imaging, image interpretation, and clinical implications. **Radiographics**, v. 25, p. 381-398, 2005.

SYMMONS, D. P., BANKHEAD, C. R., HARRISON, B. J., BRENNAN, P., SILMAN, A. J., BARRETT, E. M., SCOTT, D. G. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for

the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. **Arthritis Rheum**, v. 40, p. 1955-1961, 1997.

SZEKANECZ, Z., PAKOZDI, A., SZENTPETERY, A., BESENYEI, T., KOCH, A. E. Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis. **Front Biosci (Elite Ed)**, v. 1, p. 44-51, 2009.

TAKEBA, Y., SUZUKI, N., KANEKO, A., ASAI, T., SAKANE, T. Evidence for neural regulation of inflammatory synovial cell functions by secreting calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal peptide in patients with rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 42, p. 2418-2429, 1999.

TAMBORENEA, M. N., PISONI, C., TOLOZA, S., MYSLER, E., TATE, G., PEREIRA, D., & LAZARO, M. Work instability in rheumatoid arthritis patients from Argentina: prevalence and associated factors. **Rheumatol Int**, v. 35, n. 1, p. 107-114, Jan 2015.

TANAKA, YOSHIYA; MOLA, EMILIO MARTIN. IL-6 targeting compared to TNF targeting in rheumatoid arthritis: studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab. *Annals of the rheumatic diseases*, v. 73, n. 9, p. 1595-1597, 2014.

TAYLOR-CLARK, T. E., GHATTA, S., BETTNER, W., UNDEM, B. J. Nitrooleic acid, an endogenous product of nitrative stress, activates nociceptive sensory nerves via the direct activation of TRPA1. **Mol Pharmacol**, v. 75, p. 820-829, 2009.

TAYLOR- CLARK, T. E., MCALEXANDER, M. A., NASSENSTEIN, C., SHEARDOWN, S. A., WILSON, S., THORNTON, J., UNDEM, B. J. Relative contributions of TRPA1 and TRPV1 channels in the activation of vagal bronchopulmonary Cfibres by the endogenous autacoid 4-oxononenal. **J. Physiol**, v. 586, p. 3447-3459, 2008.

TOTH, P.; BERND, R. Severe leukopenia in a rheumatoid arthritis patient treated with a methotrexate/leflunomide combination. *Rev Bras Reumatol.*, v. 54, n. 2, p. 152-154, 2014.

TREVISAN, G., HOFFMEISTER, C., ROSSATO, M. F., OLIVEIRA, S. M., SILVA, M. A., INEU, R. P., GEPPETTI, P. Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Receptor Stimulation by Hydrogen Peroxide Is Critical to Trigger Pain During Monosodium Urate-Induced Inflammation in Rodents. **Arthritis & Rheumatism**, v. 65, n. 11, p. 2984-2995, 2013.

TREVISANI, M., SIEMENS, J., MATERAZZI, S., BAUTISTA, D. M., NASSINI, R., CAMPI, B., GATTI, R. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 13519-13524, 2007.

TREVISANI, M., SIEMENS, J., MATERAZZI, S., BAUTISTA, D. M., NASSINI, R., CAMPI, B., GATTI, R. 4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 33, p. 13519-13524, 2007.

TSUJI, G., KOSHIBA, M., NAKAMURA, H., KOSAKA, H., HATACHI, S., KURIMOTO, C., KUMAGAI, S. Thioredoxin protects against joint destruction in a murine arthritis model. **Free Radic Biol Med**, v. 40, p. 1721-1731, 2006.

UCHIDA, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. **Prog Lipid Res**, v. 42, p. 318-343, 2003.

ULEVITCH, R.J.; TOBIAS, P.S. receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Annu Rev Immunol**, v. 13, p. 437-457, 1995.

VALENCIA, X., STEPHENS, G., GOLDBACH-MANSKY, R., WILSON, M., SHEVACH, E. M., LIPSKY, P. E. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. **Blood**, v. 108, p. 25361, 2006.

VAN DER HEIJDE, D. M. Radiographic imaging: the “gold standard” for assessment of disease progression in rheumatoid arthritis. **Rheumatology (Oxford)**, v. 39, Suppl. 1, p. 9-16, 2000.

VAY, L., GU, C., MCNAUGHTON, P. A. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. **Br J Pharmacol**, v. 165, p. 787-801, 2012.

VENABLES, P. J. W.; MAINI, R. N. Diagnosis and differential diagnosis of rheumatoid arthritis. **UpToDate**, 2012b.

VENABLES, P.; MAINI, R. Clinical features of rheumatoid arthritis. **UpToDate**, 2012a.

VIATTE, S., PLANT, D., HAN, B., FU, B., YARWOOD, A., THOMSON, W., MORGAN, A. W. Association of HLA-DRB1 haplotypes with rheumatoid arthritis severity, mortality, and treatment response, **JAMA**, v. 313, n. 16, p. 1645-56. 28 Apr 2015.

WANG, T., LI, J., JIN, Z., WU, F., LI, Y., WANG, X., ZHOU, Q. Dynamic Frequency of Blood CD4+CD25+ Regulatory T Cells in Rats with Collagen-induced Arthritis. **Korean J Physiol Pharmacol**, v. 19, p. 83-88, Mar. 2015.

WEGNER, N., WAIT, R., SROKA, A., EICK, S., NGUYEN, K. A., LUNDBERG, K., VENABLES, P. J. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and  $\alpha$ -enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheum**, v. 62, p. 2662-2672, 2010.

WEINBLATT, M. E., KEYSTONE, E. C., FURST, D. E., MORELAND, L. W., WEISMAN, M. H., BIRBARA, C. A., CHARTASH, E. K. Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. **Arthritis Rheum**, v. 48, n. 1, p. 35-45, Jan 2003.

WENDLER, J., BURMESTER, G. R., SÖRENSEN, H., KRAUSE, A., RICHTER, C., TONY, H. P., DÖRNER, T. Rituximab in patients with rheumatoid arthritis in routine practice (GERINIS): six-year results from a prospective, multicentre, non-interventional study in 2,484 patients. **Arthritis Res Ther**, v. 16, p. R80, 2014.

WENDT, M. M. N., SÁ-NAKANISHI, A. B., GHIZONI, C. V. C., BERSANI-AMADO, C. A., PERALTA, R. M., BRACHT, A., COMAR, J. F. Determination of oxidative stress in the brain of rats with adjuvant-induced arthritis. **Exp Mol Pathol**, v. 98, p. 549-557, 2015.

WESTLAKE, S. L., COLEBATCH, A. N., BAIRD, J., CURZEN, N., KIELY, P., QUINN, M., EDWARDS, C. J. Tumour Necrosis Factor Antagonists and the Risk of Cardiovascular Disease in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Systemic Literature Review. **Rheumatology (Oxford)**, v. 50, n. 3, p. 518-531, 2011.

WEYAND, C. M. Immunopathologic aspects of rheumatoid arthritis: who is the conductor and who plays the immunologic instrument? **J Rheumatol**, v. 34, n. 79, p. 9-14, 2007.

WOOLF, Clifford J. What is this thing called pain?. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3742-3744, 2010.

XIE, L., LIN, A. S., KUNDU, K., LEVENSTON, M. E., MURTHY, N., GULDBERG, R. E. Quantitative imaging of cartilage and bone morphology, reactive oxygen species, and vascularization in a rodent model of osteoarthritis. **Arthritis Rheum**, v. 64, n. 6, p. 1899-1908, 2012.

YANG, M., DENG, J., LIU, Y., KO, K. H., WANG, X., JIAO, Z., LAU, C. S. IL-10-producing regulatory B10 cells ameliorate collagen-induced arthritis via suppressing Th17 cell generation. **The American journal of pathology**, v. 180, n. 6, p. 2375-2385, 2012.

YANG, S., LIU, F., WANG, Q. J., ROSENBERG, S. A., MORGAN, R. A. The Shedding of CD62L (L-Selectin) Regulates the Acquisition of Lytic Activity in Human Tumor Reactive T Lymphocytes. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22560, 2011.

YANG, Y., SHARMA, R., SHARMA, A., AWASTHI, S., AWASTHI, Y. C. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. **Acta biochimica polonica-english edition-**, v. 50, n. 2, p. 319-336, 2003.

YU, E. W., DOLTER, K. E., SHAO, L. E., YU, J. Suppression of IL-6 biological activities by activin A and implications for inflammatory arthropathies. **Clinical and experimental immunology**, v. 112, n. 1, p. 126-132, 1998.

YU, J.; DOLTER, K. E. Production of activin A and its roles in inflammation and hematopoiesis. **Cytokines, cellular & molecular therapy**, v. 3, n. 3, p. 169-177, 1997.

ZHAO, P. W., JIANG, W. G., WANG, L., JIANG, Z. Y., SHAN, Y. X., JIANG, Y. F. Plasma levels of IL-37 and correlation with TNF- $\alpha$ , IL-17A, and disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e95346, 2014.

#### 4. LISTA DE PUBLICAÇÕES

- **Transient receptor potential ankyrin 1 channel expression on peripheral blood leukocytes from rheumatoid arthritic patients and correlation with pain and disability; Publicado na *Frontiers in Pharmacology* em 2017**
  
- **Treatment with either leflunomide or adalimumab ameliorates anaemia in patients with rheumatoid arthritis; Submetido à *Annals of the Brazilian Academy of Sciences* em 2017**

**ARTIGO I**

**Transient receptor potential ankyrin 1 channel expression on peripheral blood leukocytes from rheumatoid arthritic patients and correlation with pain and disability**

**Publicado na *Frontiers in Pharmacology***



# Transient Receptor Potential Ankyrin 1 Channel Expression on Peripheral Blood Leukocytes from Rheumatoid Arthritic Patients and Correlation with Pain and Disability

Ione C. de P. Pereira<sup>1</sup>, Saulo J. F. Mendes<sup>1</sup>, Domingos M. S. Pereira<sup>1</sup>, Thayanne F. Muniz<sup>1</sup>, Valderlane L. P. Colares<sup>1</sup>, Cinara R. A. V. Monteiro<sup>1,2</sup>, Mahiba M. R. de S. Martins<sup>3</sup>, Marcos A. G. Grisotto<sup>1,4</sup>, Valério Monteiro-Neto<sup>1,2</sup>, Sílvia G. Monteiro<sup>1,2</sup>, João B. Calixto<sup>5</sup>, Susan D. Brain<sup>6</sup> and Elizabeth S. Fernandes<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

**Edited by:**  
Stefania Tacconelli,  
Università degli Studi "G. d'Annunzio"  
Chieti-Pescara, Italy

**Reviewed by:**  
Tseng-Shyan Lee,  
National Yang-Ming University, Taiwan  
Mária Dux,  
University of Szeged, Hungary

**\*Correspondence:**  
Elizabeth S. Fernandes  
elizabeth.s.fernandes@ucsma.br

**Specialty section:**  
This article was submitted to  
Inflammation Pharmacology,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

**Received:** 31 October 2016  
**Accepted:** 24 January 2017  
**Published:** 10 February 2017

**Citation:**  
Pereira IC, Mendes SJF,  
Pereira DMS, Muniz TF, Colares VLP,  
Monteiro CRAV, Martins MMRS,  
Grisotto MAC, Monteiro-Neto V,  
Monteiro SG, Calixto JB, Brain SD  
and Fernandes ES (2017) Transient  
Receptor Potential Ankyrin 1 Channel  
Expression on Peripheral Blood  
Leukocytes from Rheumatoid Arthritic  
Patients and Correlation with Pain  
and Disability. *Front. Pharmacol.* 8:63.  
doi: 10.3389/fphar.2017.00063

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação, Universidade Ceuma, São Luís, Brazil, <sup>2</sup> Programa de Pós-graduação, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brazil, <sup>3</sup> Centro de Especialidades Médicas Vênus, São Luís, Brazil, <sup>4</sup> Instituto Florença, São Luís, Brazil, <sup>5</sup> Centro de Invenção e Ensaios Pré-Clinicos-CIEE, Florianópolis, Brazil, <sup>6</sup> Vascular Biology and Inflammation Section, BHF Cardiovascular Centre of Excellence, King's College London, London, UK

Patients with rheumatoid arthritis (RA) suffer from pain and joint disability. The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel expressed on sensory neurones and non-neuronal cells mediates pain transduction and inflammation and it has been implicated in RA. However, there is little information on the contribution of TRPA1 for human disease. Here, we investigated the expression of TRPA1 on peripheral blood leukocytes and the circulating levels of its endogenous activators 4-hydroxynonenal (4-HNE) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in RA patients treated or not with the anti-rheumatic leflunomide (LFN) or the anti-TNF $\alpha$  adalimumab (ADA). We also assessed whether TRPA1 expression correlates with joint pain and disability, in addition to the immune changes in RA. TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes correlated with pain severity and disability. TRPA1 levels on these cells were associated with the numbers of polymorphonuclear and the activation of CD14<sup>+</sup> cells. No correlations were found between the lymphocyte population and TRPA1 expression, pain or disability. Patients recently diagnosed with RA expressed increased levels of TRPA1 on their leukocytes whilst treatment with either LFN or ADA down-regulated this receptor probably by reducing the numbers of polymorphonuclears and the activation of CD14<sup>+</sup> cells. We suggest that the activation levels of CD14<sup>+</sup> cells, the numbers of PMNs in the peripheral blood and the expression of TRPA1 on peripheral blood leukocytes correlate with RA progression, affecting joint pain sensitivity and loss of function.

**Keywords:** TRPA1, peripheral blood leukocytes, rheumatoid arthritis, polymorphonuclear cells, CD14<sup>+</sup> cell activation

## INTRODUCTION

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disease that affects approximately 1% of the population worldwide. Pain and loss of joint function are hallmarks of RA. It leads to diminished quality of life and increased burden on national health systems. Whilst non-steroidal and steroidal drugs have been used for pain management, RA treatment consists of disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) and biologicals which do not always halt disease progression.

The transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is a member of the transient receptor potential (TRP) family, expressed on sensory neurones, in addition to non-neuronal cells (for review see: Fernandes et al., 2012; Chen and Hackos, 2015). Activated by endogenously produced inflammatory mediators such as the oxidative stress products 4-hydroxynonenal (4-HNE; Trevisani et al., 2007) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ; Andersson et al., 2008; Bessac et al., 2008), TRPA1 has been implicated in pain transduction and inflammation (for review see: Fernandes et al., 2012; Chen and Hackos, 2015). Since the discovery of TRPA1, evidence has suggested that its functional expression on sensory neurones innervating the joints and non-neuronal cells composing the joints such as synoviocytes (Kochukov et al., 2006) and chondrocytes (Nummenmaa et al., 2016) may contribute to RA progression and the associated pain. Recently, functional TRPA1 was also found on immune cells (Billeter et al., 2015; Bertin et al., 2016; Mendes et al., 2016) that are known to play a role in RA. It is possible thus, that TRPA1 expression and activation on these cells further amplify inflammation as they migrate in to the joints during reactive RA. Although compelling, most of the evidence arises from animal models, with little known role in human disease, especially on how TRPA1 expression influences components of the immune response in RA.

Transient receptor potential ankyrin 1 expression on peripheral blood leukocytes has been linked to pain sensitivity in neuropathic patients (Sukenaga et al., 2016). We hypothesized that TRPA1 is up-regulated on peripheral blood leukocytes in RA and that this is associated with increased joint pain and reduced life quality. Therefore, we investigated the expression of TRPA1 on peripheral blood leukocytes and the circulating levels of 4-HNE and  $H_2O_2$  in RA patients treated or not with either the DMARD leflunomide (LFN) or the anti-TNF $\alpha$  adalimumab (ADA). We also assessed whether TRPA1 expression correlates with joint pain and disability, in addition to the immune changes in RA.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

A total of 40 patients (men and women) aged  $\geq 30$  years and clinically diagnosed with RA, were recruited for participation in the study. Patients included those who have just been diagnosed with RA but naive for DMARDs and biologicals ( $n = 10$ ); patients under LFN (20 mg/day, *per os*,  $n = 15$ ) and patients under biological (ADA; 40 mg every 2 weeks, subcutaneously,  $n = 15$ )

therapy for at least 8-months and less than 12-months. Patients presented a score  $\geq 6$  on the 2010 ACR-EULAR Classification Criteria For RA as previously detailed (Aletaha et al., 2010). Healthy subjects ( $n = 15$ ) were used as controls and included those who had no history of recent infections, malignancy or other autoimmune diseases and no present or previous use of DMARDs, biologicals or experimental drugs. All individuals were assessed for pain level and disability by the Stanford Health Assessment Questionnaire (HAQ; for review see: Bruce and Fries, 2003). Accordingly, disability was evaluated by the HAQ-disability index which assesses the patient's difficulty in performing his/her usual activities. Pain levels were determined through the visual analog scale (VAS), in which the patient indicates in a scale from 0 to 100, how much pain he/she felt in the past week (0- indicates no pain and 100-indicates severe pain). Ten millilitres (ml) of peripheral blood were collected from each patient for separation of plasma, serum and peripheral blood leukocytes. The study was reviewed and approved by the Human Research Ethics Committee of the Universidade CEUMA and was performed in compliance with the Declaration of Helsinki. A written informed consent was obtained from each participant.

### Serum Rheumatoid Factor

For rheumatoid factor quantification we used a rheumatoid factor particle-enhanced immunoturbidimetric method (RF II- Tina quant RF II, COBAS) in a COBAS INTEGRA 400 analyzer (Roche Diagnostics). For this, samples were initially diluted (1:5) and then, serial dilutions were prepared automatically (up to 1:128). Samples (50  $\mu$ l) were incubated with latex particles coated with monoclonal anti-rheumatoid factor antibodies. Agglutination, denoted by formation of aggregates in positive samples, was determined turbidimetrically. Results are expressed as international units (IU) per litre (l) of sample.

### Serum C-Reactive Protein

For C-reactive protein quantification we used a CRP particle-enhanced immunoturbidimetric method (CRPL3- C Reactive Protein Gen 3, COBAS) in a COBAS INTEGRA 400 analyzer (Roche Diagnostics). For this, samples were initially diluted (1:2) and then, serial dilutions were prepared automatically (up to 1:128). Samples (50  $\mu$ l) were incubated with latex particles coated with monoclonal anti-C-reactive protein antibodies. Agglutination, denoted by formation of aggregates in positive samples, was determined turbidimetrically. Results are expressed as milligrams (mg) per millilitre (ml) of sample.

### Plasma 4-HNE Levels

Plasma samples were separated by centrifugation (15 min, 800  $\times g$ ) and evaluated for 4-HNE content by using a commercial OxiSelect™ HNE Adduct Competitive ELISA Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Results are expressed as levels of 4-HNE in micrograms ( $\mu$ g) per ml.

### Plasma $H_2O_2$ Levels

$H_2O_2$  production in plasma samples was measured by using a  $H_2O_2$ /peroxidase assay kit (Amplex Red  $H_2O_2$ /Peroxidase

assay kit; Molecular Probes, Invitrogen, Brazil). The assay was performed according to the manufacturer's instructions. Briefly, 50  $\mu$ l of plasma were incubated with 50  $\mu$ l of a solution containing NaPO<sub>4</sub> 0.05 M (pH 7.4), HRP 0.2 U/ml and Amplex Red Reagent (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine) 25.7 mg/ml, for 2 h, at 37°C. Samples incubated with NaPO<sub>4</sub> 0.05 M only were used as controls. After incubation, the reaction was read at 560 nm. After subtraction of background readings, the absorbance in each sample was compared with that obtained from a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0–40  $\mu$ M) standard curve. Results are expressed as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in micromolar ( $\mu$ M).

### Plasma TNF $\alpha$ Levels

The plasma levels of TNF $\alpha$  were evaluated by using a human cytometric bead array (CBA) cytokine kit (BD Biosciences, Brazil) according to the manufacturer's instructions. Analysis was performed on a FacsCalibur cytometer flow cytometer (BD Biosciences-Immunocytometry Systems). Results were calculated in CBA FCAP Array software (BD Biosciences, Brazil) and are expressed as pg/ml.

### TRPA1 Expression on Peripheral Blood Leukocytes

For analysis of human TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes, samples were prepared and assayed in a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit, according to the manufacturer's instructions (Cloud-Clone Corp, Houston, TX, USA). Briefly, samples were collected and the red blood cells were lysed with Cell Lysis Buffer (BD Pharmingen, Brazil). Total leukocytes were then separated by centrifugation (30 min, 800  $\times$  g), resuspended in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and ultrasonicated for four times. Cell lysates were centrifuged (10 min, 800  $\times$  g, 4°C) to remove cell debris and kept at –70°C for further analysis. On the day of the experiments, samples were defrosted and assayed. Results are expressed as nanograms of TRPA1 per milligram of protein (ng/mg) in each sample.

### Flow Cytometry Analysis

For flow cytometry analysis, peripheral blood samples underwent red blood cell lysis as previously described for the quantification of TRPA1 on leukocytes. Single-cell suspensions were prepared and cells were then stained with Trypan blue (Sigma-Aldrich, Brazil) and assessed for viability in a haemocytometer. Cells ( $5 \times 10^6$ ) were washed, resuspended in flow cytometry buffer [(2% fetal calf serum (Invitrogen, Brazil) in phosphate buffered saline-PBS (Sigma-Aldrich, Brazil)), and stained with directly conjugated monoclonal antibodies (BD Biosciences or eBiosciences, Brazil): anti-CD4 PE-Cy5 (clone RPA-T4), anti-CD14 FITC (clone 61D3), anti-CD19 FITC (clone HIB19), anti-CD25 PE (clone BC96; activation marker), anti-CD69 (clone FNS0; activation marker), anti-CD127 FITC (clone eBioRDR5; activation marker), anti-HLA-DR PE-Cy5 (clone LN3). In order to discriminate regulatory T cells from activated CD4<sup>+</sup> T cells, gates were placed on CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>high</sup> cell populations, respectively.

Events were acquired on a BD Accuri C6 (BD Biosciences-Immunocytometry Systems) and analyzed using FlowJo software (Tree Star Inc.). Additionally, differential cell populations [polymorphonuclear (PMNs) and mononuclear cells] were identified by size and granularity through flow cytometry. Results are expressed as well as number of cells per mm<sup>3</sup>, except for HLA-DR, expressed as mean fluorescence.

### Data Analysis

Data are represented as mean  $\pm$  SD or median and interquartile range (25–75th; IQR), depending on their distribution. Accordingly, we used parametric (ANOVA followed by Bonferroni's test) or non-parametric (Kruskal-Wallis) tests to determine the significance of differences between groups in the HAQ-DI and VAS pain scale scores; TRPA1, 4-HNE, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and TNF $\alpha$  levels; and leukocyte subpopulations. Correlations between the different parameters were determined using Spearman's rho. Statistical analysis was undertaken using IBM SPSS Statistics 20. *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

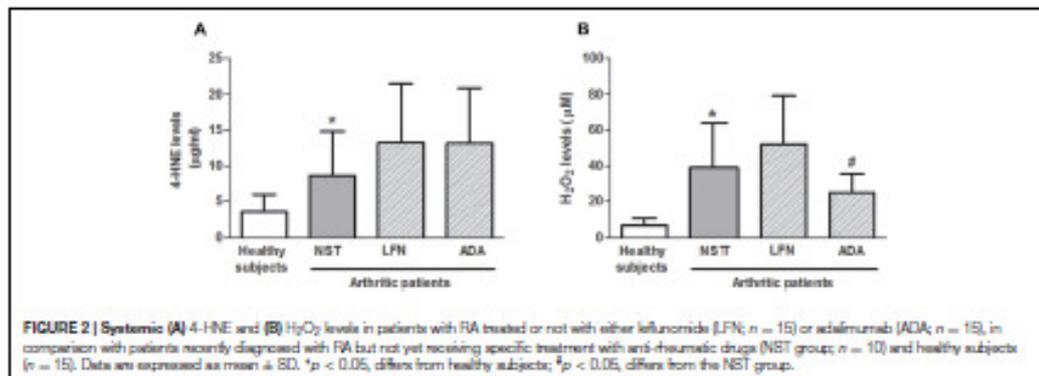
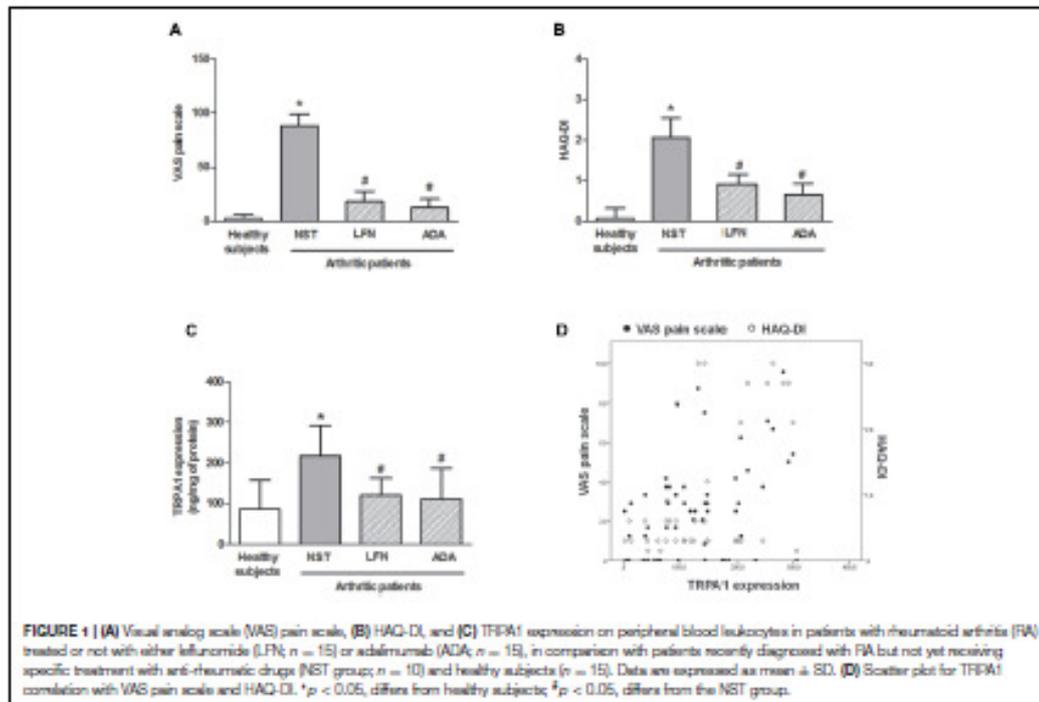
## RESULTS

### Subject Characteristics

Data depicted on Table 1 shows that the arthritic population primarily consisted of women (75%). Also, most of the recently diagnosed arthritic patients (those receiving no specific treatment with anti-rheumatic drugs, NST group) presented disease for less than 10 years (80%) whilst 60% of the patients under treatment with LFN and 80% of the patients under treatment with ADA had disease symptoms for longer than 10 years. Swollen joints were present in 90% of the recently diagnosed patients. These patients also exhibited higher levels of C-reactive protein and rheumatoid factor. This symptom was less noticeable in those taking either LFN (33.3% of the patients) or ADA (20% of the patients). The incidence of lumps and deformities was higher in patients receiving LFN or ADA, in comparison with patients recently diagnosed with RA. Nine women and six men composed the population of healthy subjects, with an average age of  $39.6 \pm 4.6$  years.

### TRPA1 Expression on Leukocytes Correlates with Joint Pain and Disability

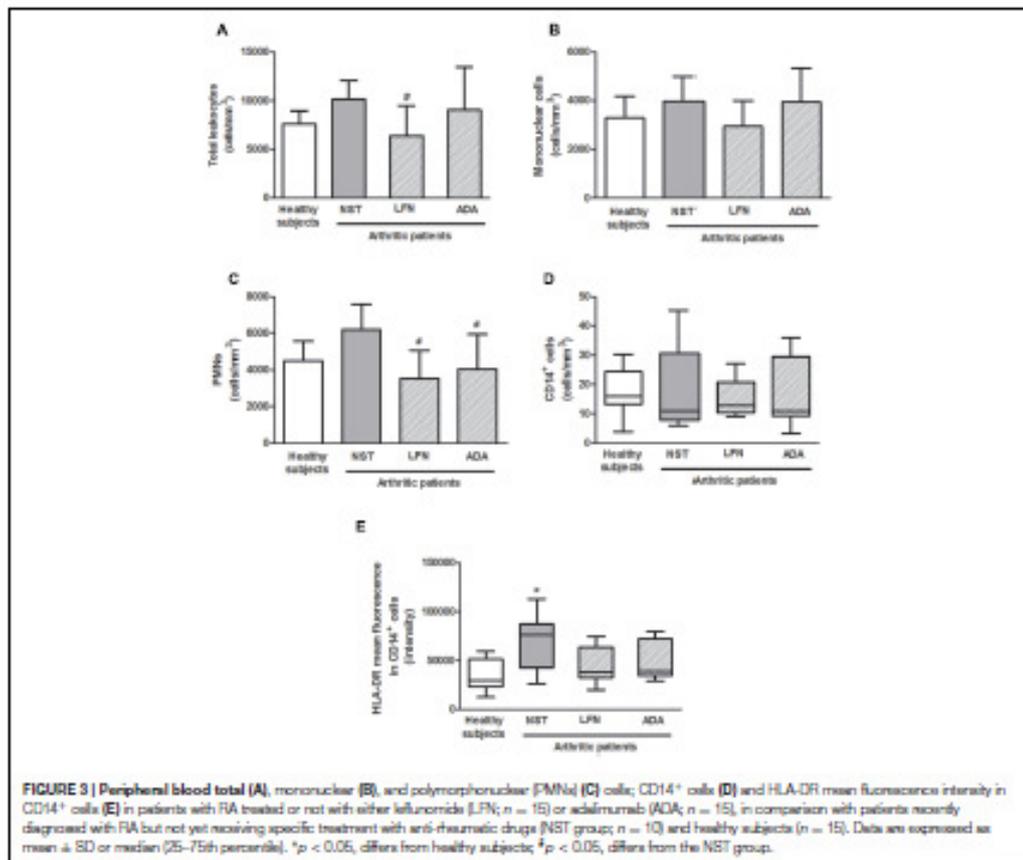
As shown in Figure 1, the NST group presented higher levels of joint pain (VAS pain scale; Figure 1A) and increased disability (HAQ disability index, HAQ-DI; Figure 1B) when compared with healthy subjects and patients treated with either LFN or ADA. Pain and disability levels correlated with TRPA1 expression levels on leukocytes ( $r = 0.329$  and  $r = 0.390$ , respectively;  $p < 0.05$ ; Figure 1D) as this receptor was markedly increased (2.6-fold) in patients who had been recently diagnosed with RA in comparison with those of healthy subjects and patients under LFN or ADA therapy (Figure 1C). Healthy subjects and patients taking LFN and ADA expressed ~50% less TRPA1 on their leukocytes than those of NST patients.



and disability in RA patients. To the best of our knowledge, this is the first study showing that patients recently diagnosed with RA express increased levels of TRPA1 on their leukocytes and that the treatment with either LFN or ADA down-regulates this receptor.

Transient receptor potential ankyrin 1 channels expressed on neuronal tissues have been widely predicted as important transducers of pain sensation (for review see: Chen and Hackos, 2015). Recently, TRPA1 was found to contribute to

joint pain and inflammation in a murine model of chronic arthritis induced by complete Freund's adjuvant (Fernandes et al., 2011; Horváth et al., 2016). The discovery of functional TRPA1 on cells located in the joints such as synoviocytes and chondrocytes (Kochukov et al., 2006; Nummenmaa et al., 2016), in addition to its expression on immune cells (Billeter et al., 2015; Bertin et al., 2016; Mendes et al., 2016) have unveiled novel pathways on the peripheral modulation of pain. In a



recent report, TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes was found to be associated with pain sensitivity (Sukenaga et al., 2016). Indeed, patients with increased neuropathic pain symptoms presented with lower TRPA1 mRNA levels on their leukocytes. Similarly, Bell et al. (2014) showed that individuals with lower pain thresholds express lower TRPA1 mRNA levels in peripheral tissues such as the skin. Here, we show evidence on that TRPA1 protein expression is augmented in RA patients with increased pain and disability. Although both neuropathic and arthritic pain are of chronic nature, the different results obtained in these studies may be due to differences in TRPA1 quantification (mRNA × protein), length of disease and immunological components underlying these pathologies.

Here, TRPA1 expression was analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay. Enzyme-linked immunosorbent assays allow the simultaneous evaluation of many samples to a given protein with high sensitivity, but their specificity

depends on assay conditions. Of note, their specificity may be comparable to those of western blot analysis for the detection of protein expression; however, results can differ depending on the antigenic preparation used in the two assays (Dittadi et al., 1993; Révélén et al., 2002; Liu et al., 2009). Importantly, TRPA1 expression was previously shown to be increased on leukocytes such as monocytes and lymphocytes in other inflammatory conditions including in LPS challenge and inflammatory bowel disease (Billeter et al., 2015; Bertin et al., 2016). It is possible that once increased, TRPA1 expression contributes to the progression or outcome of inflammatory diseases.

#### 4-HNE and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Levels Are Increased in RA Patients

The endogenously produced oxidants 4-HNE and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are suggested to play a role in RA, contributing to disease progression

TABLE 2 | Peripheral blood leukocyte populations in healthy subjects and arthritic patients.

Leukocyte population(cells/mm <sup>3</sup> )	Healthy subjects	Arthritic patients		
		NST	LFN	ADA
CD4 <sup>+</sup>	309.9 ± 192.6	420.0 ± 326.2	186.5 ± 90.7 <sup>#</sup>	501.0 ± 349.2
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>high</sup>	32.7 (21.3–61.8)	42.0 (27.5–132.6)	19.8 (13.2–24.3) <sup>#</sup>	47.8 (16.7–100.5)
CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>low</sup>	33.6 ± 16.1	43.3 ± 30.5	19.5 ± 11.7 <sup>#</sup>	51.2 ± 35.1
CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	51.3 ± 33.0	93.8 ± 104.7	36.7 ± 24.6	75.8 ± 58.5
CD8 <sup>+</sup>	138.6 ± 83.3	254.9 ± 276.8	108.6 ± 73.9 <sup>#</sup>	272.0 ± 237.4
CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	23.0 ± 16.8	38.9 ± 33.8	17.1 ± 16.1	44.0 ± 47.3
CD19 <sup>+</sup>	33.6 (20.4–45.5)	60.2 (17.0–101.1)	38.3 (19.8–75.7)	103.4 (22.9–148.7)
CD19 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	8.5 ± 5.4	28.2 ± 34.8	17.5 ± 14.2	17.5 ± 19.2

Samples were obtained from patients with rheumatoid arthritis (RA) treated or not with either leflunomide (LFN; *n* = 15) or adalimumab (ADA; *n* = 15) and compared with patients recently diagnosed with RA but not yet receiving specific treatment with anti-rheumatic drugs (NST group; *n* = 10) and healthy subjects (*n* = 15). Data are expressed as mean ± SD. <sup>#</sup>*p* < 0.05, differs from the NST group. Variables are expressed as mean ± SD or median (25–75th percentile; IQR).

(Remans et al., 2005; Yin et al., 2015). Recently, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was suggested to be critical to T cell differentiation (Abimannan et al., 2016). Indeed, the circulating levels of reactive oxygen species such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and superoxide were recently found to be strongly and positively correlated with RA symptoms and disease activity markers (Khojah et al., 2016). Similarly, plasma 4-HNE levels are elevated in RA patients (Luczaj et al., 2016). Both 4-HNE and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> have been suggested as biomarkers for monitoring RA progression and are known activators of TRPA1 (Trevisani et al., 2007; Andersson et al., 2008; Bessac et al., 2008).

Here, 4-HNE levels were raised in RA. No significant differences were found in the 4-HNE levels between the arthritic groups, although a correlation between the circulating levels of 4-HNE and disability was observed in the NST group only. Our data also show that arthritic patients presented higher levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in their plasma, and that this oxidant is reduced in RA patients under ADA therapy.

Neither 4-HNE nor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were found to correlate with the TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes or pain. It is possible that the ongoing oxidative stress may not affect TRPA1 expression on these cells, and thus, may not affect pain sensitivity mediated by this channel in RA.

TNF $\alpha$  plays a central role in RA pathophysiology, mediating bone resorption and joint pain and inflammation in RA, in addition to contributing to extra-articular disease (for review see: McInnes et al., 2016). Recent evidence indicates that TRPA1 mediates TNF $\alpha$ -induced pain *in vivo* (Fernandes et al., 2011), and that this cytokine enhances TRPA1 expression on non-neuronal cells (El Karim et al., 2015). Therefore, we assessed the circulating levels of TNF $\alpha$  in healthy subjects and in RA patients. No differences were observed between the groups. Of note, we were not able to detect circulating TNF $\alpha$  in 50% of the samples obtained from NST patients. Although being important for the transition of RA toward chronicity, TNF $\alpha$  levels may peak during the maintenance of established disease (McInnes et al., 2016). TNF $\alpha$  levels were not correlated with any of the parameters assessed. This may

be related to the fact this cytokine was not detected in all patients.

### The Correlation between TRPA1 Expression on Peripheral Blood Leukocytes and Pain and Disability in RA Is Associated with the Numbers of PMN and Activation of CD14<sup>+</sup> Cells

Our data shows that the correlation between TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes, pain and disability in arthritic patients is associated with the numbers of PMNs and with the activation of CD14<sup>+</sup> cells. Horvath et al. (2016) found that TRPA1 ablation decreases neutrophil accumulation into the joints of animals with arthritis. Also, TRPA1 was recently shown to mediate the acute inflammatory responses mediated by CD14<sup>+</sup> expressing cells such as macrophages (Mendes et al., 2016) and monocytes (Billeter et al., 2015). Additionally, the functional expression of TRPA1 on CD4<sup>+</sup> lymphocytes was previously reported and the activation of this channel was suggested to down-regulate T-cell mediated responses in chronic inflammation (Bertin et al., 2016). However, we did not observe any correlations between the circulating lymphocyte subpopulations and TRPA1 expression or pain and disability in arthritic patients. Also, no correlations were found between lymphocyte subpopulations and the systemic levels of 4-HNE and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. It is possible though that lymphocytes located in to the joints differently influence RA progression as this receptor may suffer the influence of a plethora of inflammatory molecules (i.e., oxidative stress products and cytokines such as TNF $\alpha$ ) released in higher levels in this microenvironment.

We found that RA patients receiving either LFN or ADA presented lower numbers of circulating PMNs and less activation of CD14<sup>+</sup> cells than those of the NST group. Both LFN and ADA are able to directly suppress immune cell proliferation and migration in to the joints. LFN is known to block T cell proliferation by inhibiting dihydro-orotate dehydrogenase and

the synthesis of pyrimidine (Fragoso and Brooks, 2015), and to reduce the expression of adhesion molecules on peripheral blood mononuclear cells and their migration in to the inflamed synovia (Grisar et al., 2004). ADA was also shown to reduce peripheral blood leukocyte (monocytes and PMNs) adhesion to the endothelium (Rios-Navarro et al., 2015). Inhibitory effects on T cell proliferation via macrophage-dependent mechanisms were also observed for ADA (Vos et al., 2011). Taking these evidences in to account, it is possible to suggest that in the NST group, infiltrating leukocytes expressing TRPA1 may contribute to exacerbate joint inflammation, a response that may be attenuated in patients receiving anti-rheumatic therapy.

In summary, our data demonstrates that TRPA1 expression on peripheral blood leukocytes is increased in NST RA patients and this is associated with higher numbers of circulating neutrophils and increased CD14<sup>+</sup> cell activation. In turn, these changes affect pain and disability as TRPA1-expressing leukocytes may migrate in to the joints during reactive RA further amplifying inflammation. Finally, reduced TRPA1 expression in patients treated with either LPN or ADA is accompanied by reduction of the circulating PMN population and decreased activation of CD14<sup>+</sup> cells, thus resulting in decreased pain and disability in RA. These results suggest that the activation levels of CD14<sup>+</sup> cells and the numbers of PMNs in the peripheral blood is associated with TRPA1 expression and this may impact RA progression.

## REFERENCES

- Ahirmann, T., Peroumal, D., Parida, I. R., Barik, P. K., Padhan, P., and Devadas, S. (2016). Oxidative stress modulates the cytokine response of differentiated Th17 and Th1 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 99, 352–363. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.026
- Aletaha, D., Neogi, T., Sisman, A. J., Furno, I., Feldon, D. T., Birnham, C. O. I. I., et al. (2010). Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 62, 2569–2581. doi: 10.1002/art.21758
- Anderson, D. A., Gentry, C., Moss, S., and Bevan, S. (2008). Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J. Neurosci.* 28, 2485–2494. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5369-07.2008
- Bell, J. T., Loomis, A. K., Butcher, L. M., Cao, F., Zhang, B., Hyde, C. L., et al. (2014). Differential methylation of the TRPA1 promoter in pain sensitivity. *Nat. Commun.* 5, 2978. doi: 10.1038/ncomms2978
- Berlin, S., Aoki-Nomaka, Y., Lee, J., de Jong, P. R., Kim, P., Han, T., et al. (2016). The TRPA1 ion channel is expressed in CD4<sup>+</sup> T cells and restrains T-cell-mediated colitis through inhibition of TRPV1. *Gut* doi: 10.1136/gutjnl-2015-310710 [Epub ahead of print].
- Bonac, B. F., Sivula, M., von Helm, C. A., Escalera, J., Cohn, L., and Jorik, S. E. (2008). TRPA1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J. Clin. Invest.* 118, 1899–1910. doi: 10.1172/JCI34192
- Billetter, A. T., Galbraith, N., Walker, S., Lawson, C., Gardner, S. A., Sarojini, H., et al. (2015). TRPA1 mediates the effects of hypothermia on the monocyte inflammatory response. *Surgery* 158, 646–654. doi: 10.1016/j.surg.2015.03.065
- Brace, E., and Fries, J. F. (2005). The standard health assessment questionnaire: dimensions and practical applications. *Health Qual. Life Outcomes* 3, 20. doi: 10.1186/1477-7525-3-20
- Chen, J., and Hackos, D. H. (2015). TRPA1 as a drug target—promise and challenges. *Natyn Schmeldeberg Arch. Pharmacol.* 388, 451–463. doi: 10.1007/s00210-015-1088-3
- Ditadi, R., Catorzi, L., Cion, M., Brazzale, A., Capitanio, G., Gelli, M. C., et al. (1995). Comparison between western blotting, immunohistochemical and ELISA assay for p185neu quantitation in breast cancer specimens. *Anticancer Res.* 15, 1821–1824.
- El Karim, I., McCradden, M. T., Linden, G. I., Abdallah, H., Curtis, T. M., McGahon, M., et al. (2015). TNF- $\alpha$ -induced p38MAPK activation regulates TRPA1 and TRPV4 activity in odontoblast-like cells. *Am. J. Pathol.* 185, 2994–3002. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.07.020
- Fernandes, E. S., Fernandes, M. A., and Keeble, J. E. (2012). The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br. J. Pharmacol.* 166, 510–521. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x
- Fernandes, E. S., Russell, F. A., Spina, D., McDougall, J. I., Geopel, R., Gentry, C., et al. (2011). A distinct role for transient receptor potential ankyrin 1, in addition to transient receptor potential vanilloid 1, in tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced inflammatory hyperalgesia and Freund's complete adjuvant-induced monoarthritis. *Arthritis Rheum.* 63, 819–829. doi: 10.1002/art.20150
- Fragoso, Y. D., and Brooks, J. B. (2015). Leflunomide and teriflunomide: altering the metabolism of pyrimidines for the treatment of autoimmune diseases. *Exp. Rev. Clin. Pharmacol.* 8, 315–320. doi: 10.1586/17512433.2015.1019343
- Grisar, J., Aringer, M., Köller, M. D., Stammesell, G. H., Esdöck, D., Zwölfer, B., et al. (2004). Leflunomide inhibits transendothelial migration of peripheral blood mononuclear cells. *Ann. Rheum. Dis.* 63, 1632–1637. doi: 10.1136/ard.2003.018480
- Horváth, Á., Tékas, V., Boros, M., Pusgai, G., Bost, E., Borbily, F., et al. (2016). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) receptor is involved in chronic arthritis in vivo study using TRPA1-deficient mice. *Arthritis Res. Ther.* 18, 6. doi: 10.1186/s13075-015-0904-y
- Khejib, H. M., Ahmed, S., Abdel-Rahman, M. S., and Hamza, A. E. (2016). Reactive oxygen and nitrogen species in patients with rheumatoid arthritis as potential biomarkers for disease activity and the role of antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* 97, 285–291. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.06.020

## ETHICS STATEMENT

The study was reviewed and approved by the Human Research Ethics Committee of the Universidade CEUMA and was performed in compliance with the Declaration of Helsinki. A written informed consent was obtained from each participant.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

IP, SM, DP, TM, VC, CM, MM, MG, VM-N, SGM, JC, SB, and EF contributed to conception, design, data acquisition, analysis, and interpretation, drafted and critically revised the manuscript. All authors gave final approval and agree to be accountable for all aspects of the work.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; grant 3325/2013), Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA; grant 00311/14), Programa INCT-INOVAMED (grant 465430/2014-7) and Farmácia Estadual de Medicamentos Especializados do Maranhão (FEME). V.L.P. Colares is an MSc student receiving a grant from FAPEMA. S.J.F. Mendes and D.M.S. Pereira are PhD students receiving grants from CAPES.

- Kochakov, M. Y., McNearney, T. A., Fu, Y., and Westlund, K. N. (2006). Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synovial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C624–C632. doi: 10.1152/ajpcell.00553.2005
- Liu, D., Schuster, T., Baumann, M., Ross, M., Solinger, D., Lutz, J., et al. (2009). Comparison of immunoassays for the selective measurement of human high-molecular weight adiponectin. *Clin. Chem.* 55, 568–572. doi: 10.1373/clinchem.2008.112425
- Luczaj, W., Gindzińska-Szekiewicz, E., Brocka-Karpowicz, I., Andrić, L., Sierakowski, S., Zarković, N., et al. (2016). The onset of lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: consequences and monitoring. *Free Radic. Res.* 50, 304–313. doi: 10.3109/10717572.2015.1112901
- McIntyre, I. B., Buckley, C. D., and Isaacs, J. D. (2016). Cytokines in rheumatoid arthritis - shaping the immunological landscape. *Nat. Rev. Rheumatol.* 12, 63–68. doi: 10.1038/nrrheum.2015.171
- Mendes, S. J., Sousa, F. L., Pereira, D. M., Ferro, T. A., Pereira, I. C., Silva, E. L., et al. (2016). Cinnamaldehyde modulates LPS-induced systemic inflammatory response syndrome through TRPA1-dependent and independent mechanisms. *Int. Immunopharmacol.* 34, 60–70. doi: 10.1016/j.intimp.2016.02.012
- Nurminen, E., Härmäläinen, M., Moilanen, L. I., Paakari, E. L., Nieminen, E. M., Moilanen, T., et al. (2016). Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) is functionally expressed in primary human osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Res. Ther.* 18, 185. doi: 10.1186/s13075-016-1080-4
- Remans, P. H., van Oosterhout, M., Seneta, T. J., Sanders, M., Frederiks, W. M., Koudaart, K. A., et al. (2005). Intracellular free radical production in synovial T lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 52, 2003–2008. doi: 10.1002/art.21111
- Révillon, R., D'Arbonneau, F., Guillemin, L., Boedron, A., Youinou, P., and Ducrocq, M. (2002). Comparison of cell-ELISA, flow cytometry and Western blotting for the detection of antiendothelial cell antibodies. *Clin. Exp. Rheumatol.* 20, 19–26.
- Rico-Navarro, C., de Pablo, C., Collado-Díaz, V., Ordén, S., Blas-García, A., Martínez-Cacata, M. A., et al. (2015). Differential effects of anti-TNF- $\alpha$  and anti-IL-12/23 agents on human leukocyte-endothelial cell interactions. *Eur. J. Pharmacol.* 785, 355–365. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.08.054
- Sakemura, N., Ikeda-Miyagawa, Y., Yanada, D., Tsumoto, T., Nakano, S., Inui, T., et al. (2016). Correlation between DNA methylation of TRPA1 and chronic pain status in human whole blood cells. *Pain Med.* 17, 1906–1910. doi: 10.1093/pm/pfv088
- Treviñari, M., Siemens, J., Materazzi, S., Bautista, D. M., Nassiri, R., Campi, B., et al. (2007). 4-Hydroxyphenol, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 13519–13524. doi: 10.1073/pnas.0705925104
- Vos, A. C., Wildenberg, M. E., Duijvestijn, M., Verhaar, A. P., van den Brink, G. R., and Hommes, D. W. (2011). Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  antibodies induce regulatory macrophages in an Fc region-dependent manner. *Gastroenterology* 140, 221–230. doi: 10.1053/j.gastro.2010.10.008
- Yin, G., Wang, Y., Cen, X. M., Yang, M., Liang, Y., and Xie, Q. B. (2015). Lipid peroxidation-mediated inflammation promotes cell apoptosis through activation of NF- $\kappa$ B pathway in rheumatoid arthritis synovial cells. *Mediators Inflamm.* 2015, 10. doi: 10.1155/2015/460310

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Pereira, Mendes, Pereira, Manis, Calares, Monteiro, Martins, Grinotto, Monteiro-Neto, Monteiro, Galvão, Bruni and Fernandes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**ARTIGO II**

**Treatment with either leflunomide or adalimumab ameliorates anaemia in patients with rheumatoid arthritis**

**Submetido à *Annals of the Brazilian Academy of Sciences***



**Treatment with either leflunomide or adalimumab ameliorates anaemia in patients with rheumatoid arthritis**

Journal:	<i>Anais da Academia Brasileira de Ciências</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Pereira, Ione; Universidade Ceuma Sousa, Nágila ; Universidade Ceuma Pereira, Domingos; Universidade Ceuma Mendes, Saulo; Universidade Ceuma Muniz, Thayanne; Universidade Ceuma Colares, Valderlane; Universidade Ceuma da Silva, Bruna; Universidade Ceuma Monteiro, Cinara; Universidade Ceuma; Universidade Federal do Maranhao Fernandes, Anita ; Universidade do Vale do Itajai Fernandes, Elizabeth; Universidade Ceuma, Programa de Pós-graduação
Keyword:	anaemia, rheumatoid arthritis, leflunomide, adalimumab
Classifications:	Ciências Biológicas (Biological Sciences)

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4 **1 Treatment with either leflunomide or adalimumab**  
5  
6  
7 **2 ameliorates anaemia in patients with rheumatoid arthritis**  
8  
9

10 Ione Cristina de Paiva Pereira<sup>1</sup>, Nágila Caroline Fialho Sousa<sup>1</sup>, Domingos Magno  
11 Santos Pereira<sup>1</sup>, Saulo José Figueiredo Mendes<sup>1</sup>, Thyanne França Muniz<sup>1</sup>, Valderlane  
12 Lopes Pinheiro Colares<sup>1</sup>, Bruna Leticia Rosa da Silva<sup>1</sup>, Cinara Regina Aragão Vieira  
13 Monteiro<sup>1,2</sup>, Anita Maria da Rocha Fernandes<sup>3</sup>, Elizabeth Soares Fernandes<sup>1\*</sup>  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

23 <sup>1</sup>Programa de Pós-graduação, Universidade Ceuma, São Luís, MA, Brazil;  
24 <sup>2</sup>Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brazil; <sup>3</sup>Curso de Graduação em  
25 Ciência da Computação, Universidade do Vale do Itajai, Campus Kobrasol, São José,  
26 SC, Brazil.  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35

36 \*Corresponding author: Elizabeth S. Fernandes, Rua Josué Montello, no 1, Bairro  
37 Renascença II, São Luís, MA, Brazil, 65075-120. Phone: +55-98-32144252,  
38 elizabeth.soares@ceuma.br  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46

47 **Running title:** Anaemia improvement by leflunomide and adalimumab  
48

49 **Keywords:** anaemia, rheumatoid arthritis, leflunomide, adalimumab  
50

51 **Research area:** Biological Sciences  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

23 **ABSTRACT**

24 Rheumatoid arthritis is a chronic disease of the joints, which causes pain and joint  
25 disability. Anaemia is a frequent extra-articular manifestation in rheumatoid arthritis,  
26 affecting 30-70% of the patients; presenting a negative impact on patient's quality of  
27 life. Some of the drugs used in rheumatoid arthritis treatment improve anaemia; but  
28 little is known on the beneficial effects of the anti-rheumatic leflunomide or the anti-  
29 TNF $\alpha$  adalimumab, in this parameter. We investigated the incidence of anaemia in  
30 rheumatoid arthritis patients treated or not with leflunomide or adalimumab. We also  
31 assessed whether anaemia correlates with disease activity. Anaemia was present in  
32 patients who had just been diagnosed with rheumatoid arthritis and had never taken  
33 disease modifying agents or biologicals (non-specific therapy group), but not in those  
34 taking either leflunomide or adalimumab. The erythrocyte sedimentation rate was  
35 increased in patients with non-specific therapy in comparison with those taking either  
36 leflunomide or adalimumab. Anaemia correlated with increased erythrocyte  
37 sedimentation rate. We suggest that leflunomide and adalimumab may be useful in  
38 treating anaemia in patients with rheumatoid arthritis.

39

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63

## 40 I. Introduction

41 Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic disease of the joints, which causes pain and joint  
42 disability. Disease progression is characterized by intra-articular (pain and loss of joint  
43 function) and extra-articular manifestations of the disease. Anaemia is one of the most  
44 common manifestations of RA, affecting 30-70% of the patients, and it has been linked  
45 to reduced quality of life (Song et al., 2013; Ganna, 2014).

46 Also known as anaemia of inflammation, it can be triggered by increased release of  
47 cytokines, especially IL-6, in RA patients. Indeed, cytokine generation in RA has been  
48 associated with decreased iron availability, and increased absorption and retention  
49 within cells of the reticulo-endothelial; in addition to reduced numbers of red blood  
50 cells (for review see: Moreland and Curtis, 2009; Masson, 2011). Although lowering of  
51 haemoglobin levels was found not be associated with chronic fatigue in RA patients,  
52 this response has been highly associated with disease activity (Singh et al., 2014).

53 RA specific treatment comprises disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs)  
54 and biologicals that aim to reduce joint inflammation and pain, thus attenuating disease  
55 progression. Although therapy targets the intra-articular manifestations of disease, some  
56 anti-rheumatic drugs are suggested to be useful in treating the extra-articular disease.  
57 These include some anti-TNF $\alpha$  inhibitors such as anakinra, rituximab (Nyhäll-Wåhlin et  
58 al., 2012) and etanercept (Calisto Pérez et al., 2012); and DMARDs such as  
59 methotrexate when used alone or in combination with a biological (Doyle et al., 2009).  
60 Indeed, these drugs were suggested to improve haemoglobin levels, whilst reducing  
61 rheumatoid nodules.

62 The DMARD leflunomide (LFN) and the anti-TNF $\alpha$  adalimumab (ADA) are currently  
63 used to treat RA in order to reduce joint pain and inflammation, however, little is known

1  
2  
3  
4 64 on the beneficial effects of these drugs in improving anaemia in RA patients. Here, we  
5  
6 65 investigated the incidence of anaemia in RA patients treated or not with LFN or ADA.  
7  
8 66 We also assessed whether anaemia correlates with different haematological and  
9  
10 67 demographic parameters in these patients.

## 13 68 2. Materials and methods

### 16 69 2.1. Patients

19 70 A total of 40 patients (men and women) aged  $\geq 30$  years and clinically diagnosed with  
20  
21 71 RA, were recruited for participation in the study. Patients included those who have just  
22  
23 72 been diagnosed with RA and but naïve for DMARDs and biologicals ( $n=10$ ); patients  
24  
25 73 under LFN (20 mg/day, *per os*,  $n=15$ ) and patients under biological (ADA; 40 mg every  
26  
27 74 2 weeks, subcutaneously,  $n=15$ ) therapy. Patients presented a score  $\geq 6$  on the 2010  
28  
29 75 ACR-EULAR Classification Criteria For Rheumatoid Arthritis as previously detailed  
30  
31 76 (Aletaha et al., 2010). Healthy subjects ( $n=15$ ) were used as controls and included those  
32  
33 77 who had no history of recent infections, malignancy or other autoimmune diseases and  
34  
35 78 no present or previous use of DMARDs, biologicals or experimental drugs. We  
36  
37 79 recorded demographics (age, gender and duration of disease), clinical (number of  
38  
39 80 affected joints and presence or absence of rheumatoid nodules), and laboratory data. For  
40  
41 81 laboratory data collection, five millilitres (ml) of peripheral blood were collected from  
42  
43 82 each patient, in tubes containing ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), for analysis  
44  
45 83 of red blood cell numbers, haemoglobin, haematocrit and erythrocyte sedimentation rate  
46  
47 84 (ESR). The study was reviewed and approved by the Human Research Ethics  
48  
49 85 Committee of the Universidade CEUMA and was performed in compliance with the  
50  
51 86 Declaration of Helsinki. A written informed consent was obtained from each  
52  
53 87 participant.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## 88 2.2. Data Analysis

89 Data are represented as mean  $\pm$  SD. Accordingly, we used parametric (ANOVA  
90 followed by Bonferroni's test) test to determine the significance of differences between  
91 groups. Correlations between the different parameters were determined using  
92 Spearman's rho. Statistical analysis was undertaken using IBM SPSS Statistics 20. *p*  
93 values  $< 0.05$  were considered statistically significant.

## 94 3. Results

### 95 3.1. Subject characteristics

96 The majority of the arthritic population comprised of women (75%; 30 out of 40).  
97 Arthritic patients had an average age of 50 years old, with those under anti-rheumatic  
98 therapy presenting the highest averages (mean  $\pm$  SD were as follows:  $40.5 \pm 8.4$  for the  
99 NST group;  $54.6 \pm 12.1$  and  $54.9 \pm 10.9$ , for the patients treated with LFN or ADA;  
100 respectively). Recently diagnosed arthritic patients (those receiving no specific  
101 treatment with anti-rheumatic drugs, NST group) presented disease for less than 2 years  
102 (mean  $\pm$  SD of  $44.9 \pm 8.0$ ) whilst those under treatment with LFN or ADA had disease  
103 symptoms for longer than 10 years (mean  $\pm$  SD of  $54.6 \pm 12.1$  and  $51.0 \pm 13.6$ ; for LFN  
104 and ADA patients, respectively). The number of swollen joints was higher in patients  
105 recently diagnosed ( $11.0 \pm 2.7$ ) in comparison with those of patients under LFN ( $8.3 \pm$   
106  $3.1$ ) or ADA ( $7.3 \pm 2.9$ ) therapy. The incidence of rheumatoid nodules was higher in  
107 patients receiving LFN or ADA (53% and 80%, respectively), in comparison with  
108 patients recently diagnosed (30%) with RA. The majority of the subjects composing the  
109 population of healthy subjects were women (73%) with an average age of 40 years.

110

111

### 112 3.2. Treatment with either LFN or ADA attenuates anaemia in RA patients

113 As shown in Figure 1A, healthy subjects and RA patients presented similar numbers of  
114 red blood cells. However, the NST group presented lower levels of haemoglobin (15%)  
115 in comparison with those of healthy subjects (Figure 1B). A similar reduction was  
116 observed for hematocrit although this response was not significant (Figure 1C). RA  
117 patients treated with either LFN or ADA presented haemoglobin and hematocrit levels  
118 which were similar to those found in healthy subjects (Figure 1B and C). Additionally,  
119 the NST group exhibited higher ESR (16.7-fold increase) when compared with healthy  
120 subjects (Figure 1D). LFN or ADA administration in RA patients decreased ESR by  
121 64% and 55%, respectively. Haemoglobin and hematocrit levels strongly and positively  
122 correlated with the numbers of red blood cells in healthy subjects ( $r=0.946$  for both  
123 parameters;  $p<0.01$ ), NST group ( $r=0.729$  and  $r=0.848$ ; respectively,  $p<0.05$ ), and  
124 patients receiving LFN ( $r=0.839$  and  $r=0.31$ ; respectively,  $p<0.05$ ) or ADA ( $r=0.896$   
125 and  $r=0.815$ ; respectively,  $p<0.05$ ). Haemoglobin correlated with hematocrit levels in  
126 RA patients, but not healthy subjects. Correlations were  $r=0.628$  ( $p<0.05$ ),  $r=0.977$   
127 ( $p<0.01$ ) and  $r=0.937$  ( $p<0.01$ ), for the NST, LFN and ADA groups; respectively.  
128 Positive but weaker correlations were also observed between the numbers of affected  
129 joints and the levels of haemoglobin in the NST and LFN groups only ( $r=0.446$  and  
130  $r=0.451$ , respectively). No significant correlations were found between age, gender or  
131 disease time and the evaluated haematological parameters in any of the groups.

### 132 4. Discussion

133 Anaemia is common in RA patients and it has been linked with disease activity  
134 (Smyrnova, 2014). At least three pathophysiological pathways are associated with this  
135 extra-articular manifestation of RA, all involving cytokine production. Indeed, increased

1  
2  
3 136 activation of inflammatory cells during the establishment and progression of disease,  
4  
5 137 leads to an excessive production of cytokines such as TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 (Moreland  
6  
7  
8 138 and Curtis, 2009). In turn, these cytokines act on erythropoietic progenitor cells  
9  
10 139 promoting haemolysis and subsequent reduction in the numbers of circulating red blood  
11  
12 140 cells (Papadaki et al., 2002; Masson, 2011). It has also been suggested that cytokine  
13  
14 141 production in RA leads to reduction in the availability of iron (Spivak, 2000; Masson,  
15  
16 142 2011). This response has been associated with increased production of lactoferrin by  
17  
18 143 activated neutrophils and increased iron absorption and retention within cells of the  
19  
20 144 reticulo-endothelial system, leading to low circulating iron levels and low serum  
21  
22 145 binding capacity.  
23  
24  
25  
26

27 146 Although oral iron supplementation may be economic and safe for treating RA-related  
28  
29 147 anaemia, only 50% of the patients respond to this therapy (van Santen et al., 2014).  
30  
31 148 Recent evidence has suggested that treatment of inflammation itself, may improve  
32  
33 149 anaemia in RA. Indeed, anti-TNF therapy (Papadaki et al., 2002; Calisto Pérez et al.,  
34  
35 150 2012; Sakthiswary et al., 2012; Furst et al., 2013) administered alone or combined with  
36  
37 151 DMARDs (Doyle et al., 2009) are suggested to improve haemoglobin levels in RA.  
38  
39 152 However, little is known of LFN and ADA effects on anaemia. Indeed, a single study  
40  
41 153 performed by Sakthiswary and collaborators (2012) recently demonstrated that RA  
42  
43 154 patients treated with ADA exhibited improved levels of haemoglobin. Here, we present  
44  
45 155 evidence on that both LFN and ADA treatments are able to attenuate anaemia in RA  
46  
47 156 patients, denoted by increase in the levels of haemoglobin and decrease in the ESR. It is  
48  
49 157 important to highlight that these studies were performed in two very distinct populations  
50  
51 158 (Malaysian x Brazilian), indicating that RA patients of different genetic backgrounds  
52  
53 159 may benefit of ADA effects on anaemia. On the other hand, to the best of our  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 160 knowledge, we present the first evidences on that LFN may be useful in treating RA-  
5  
6 161 related anaemia.

7  
8 162 Additionally, none of the treatments affected the number of red blood cells. Indeed,  
9  
10 163 similar numbers of red blood cells were observed in all tested groups. These data  
11  
12 164 suggest that anaemia in the evaluated patients is primarily related to increased iron  
13  
14 165 retention or absorption within the reticulo-endothelial cells rather than haemolysis of  
15  
16 166 erythropoietic progenitor cells.

17  
18  
19  
20 167 We also found that the numbers of affected joints weakly correlate with the levels of  
21  
22 168 haemoglobin in the NST group and in LFN- but not ADA-treated patients. Also, no  
23  
24 169 significant correlations were observed between haemoglobin or ESR and the incidence  
25  
26 170 of rheumatoid nodules. We suggest that anaemia may correlate stronger with other  
27  
28 171 markers of disease activity, such as rheumatoid factor or C-reactive protein levels, pain,  
29  
30 172 disability, amongst others. This hypothesis is supported by previous literature (Song et  
31  
32 173 al., 2013).

33  
34  
35  
36 174 LFN or ADA effects on anaemia may be related to their inhibitory actions on  
37  
38 175 inflammation, including on cytokine generation. LFN is known to block T cell  
39  
40 176 proliferation by inhibiting the synthesis of pyrimidine (Fragoso and Brooks, 2015), and  
41  
42 177 to reduce the activation of peripheral blood mononuclear cells (Grisar et al., 2004).  
43  
44 178 ADA was also shown to reduce peripheral blood leukocyte (monocytes and PMNs)  
45  
46 179 activation (Rios-Navarro et al., 2015) and to inhibit T cell proliferation (Vos et al.,  
47  
48 180 2011). All these suppressive effects on different cytokine-producing inflammatory cells  
49  
50 181 may in turn be responsible for the attenuation of the anaemia in RA patients treated with  
51  
52 182 LFN or ADA.  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 183 Overall, we present evidence on that treatment with LFN or ADA improves anaemia in  
5  
6 184 RA, in addition to attenuating intra-articular damage, pain and disability. This is of  
7  
8 185 importance as not all RA patients respond to iron supplementation.

9  
10 186 **Conflict of Interests**

11  
12  
13 187 The authors declare no conflict of interests.

14  
15  
16 188 **Acknowledgments**

17  
18 189 This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
19  
20 190 Superior (CAPES; grant 3325/2013) and Fundação de Amparo à Pesquisa e ao  
21  
22 191 Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA; grant 00311/14).  
23  
24 192 V.L.P. Colares is an MSc student receiving a grant from FAPEMA. S.J.F. Mendes and  
25  
26 193 D.M.S. Pereira are PhD students receiving grants from CAPES.

27  
28  
29 194

30  
31  
32 195

33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

196 **References**

- 197 Calisto Pérez C, León R, León F and Ng SL. 2012. Rheumatoid arthritis and anemia:  
198 the impact of different anti-inflammatory therapies on hemoglobin levels. An  
199 observational study. *Bol Asoc Med P R* 104: 34-41.
- 200 Doyle MK, Rahman MU, Han C, Han J, Giles J, Bingham CO 3<sup>rd</sup> and Bathon J. 2009.  
201 Treatment with infliximab plus methotrexate improves anemia in patients with  
202 rheumatoid arthritis independent of improvement in other clinical outcome measures-a  
203 pooled analysis from three large, multicenter, double-blind, randomized clinical trials.  
204 *Semin Arthritis Rheum* 39: 123-131.
- 205 Fragoso YD and Brooks JB. 2015. Leflunomide and teriflunomide: altering the  
206 metabolism of pyrimidines for the treatment of autoimmune diseases. *Expert Rev Clin*  
207 *Pharmacol* 8: 315-320.
- 208 Furst DE, Kay J, Wasko MC, Keystone E, Kavanaugh A, Deodhar A, Murphy FT,  
209 Magnus JH, Hsia EC, Hsu B, Xu S, Rahman MU and Doyle MK. 2013. The effect of  
210 golimumab on haemoglobin levels in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic  
211 arthritis or ankylosing spondylitis. *Rheumatology (Oxford)* 52: 1845-1855.
- 212 Ganna S. 2014. The prevalence of anemia in rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol*  
213 54: 257-259.
- 214 Grisar J, Aringer M, Köller MD, Stummvoll GH, Eselböck D, Zwölfer B, Steiner CW,  
215 Zierhut B, Wagner L, Pietschmann P and Smolen JS. 2004. Leflunomide inhibits  
216 transendothelial migration of peripheral blood mononuclear cells. *Ann Rheum Dis* 63:  
217 1632-1637.
- 218 Masson C. 2011. Rheumatoid anemia. *Joint Bone Spine*. 78: 131-137.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 219 Moreland LW and Curtis JR. 2009. Systemic nonarticular manifestations of rheumatoid  
220 arthritis: focus on inflammatory mechanisms. *Semin Arthritis Rheum* 39: 132-143.
- 221 Nyhäll-Wåhlin BM, Petersson IF, Jacobsson C, Geborek P, Nilsson JÅ, Nilsson K,  
222 Jacobsson LT and Turesson C. 2012. Extra-articular manifestations in a community-  
223 based sample of patients with rheumatoid arthritis: incidence and relationship to  
224 treatment with TNF inhibitors. *Scand J Rheumatol* 41: 434-437.
- 225 Papadaki HA, Kritikos HD, Valatas V, Boumpas DT and Eliopoulos GD. 2002. Anemia  
226 of chronic disease in rheumatoid arthritis is associated with increased apoptosis of bone  
227 marrow erythroid cells: improvement following anti-tumor necrosis factor-alpha  
228 antibody therapy. *Blood* 100: 474-482.
- 229 Rios-Navarro C, de Pablo C, Collado-Diaz V, Orden S, Blas-Garcia A, Martínez-Cuesta  
230 MÁ, Esplugues JV and Alvarez A. 2015. Differential effects of anti-TNF- $\alpha$  and anti-IL-  
231 12/23 agents on human leukocyte-endothelial cell interactions. *Eur J Pharmacol* 765:  
232 355-365.
- 233 Sakthiswary R, Syahrul Sazliyana S, Mohd Shahrir MS, Shahril NS and Hussein H.  
234 2012. Beyond the joints in rheumatoid arthritis: Effects of adalimumab on hematologic  
235 and lipid indices. *EXCLI J* 11:142-149.
- 236 Singh H, Arya S, Talapatra P, Lather K, Mathur R, Singhanía A and Chaudhary V.  
237 2014. Assessment of fatigue in rheumatoid arthritis (by Functional Assessment of  
238 Chronic Illness Therapy-Fatigue score) and its relation to disease activity and anemia. *J*  
239 *Clin Rheumatol* 20: 87-90.
- 240 Smyrnova G. 2014. The relationship between hemoglobin level and disease activity in  
241 patients with rheumatoid arthritis. *Rev Bras Reumatol* 54: 437-440.

- 1  
2  
3 242 Song SN, Iwahashi M, Tomosugi N, Uno K, Yamana J, Yamana S, Isobe T, Ito H,  
4  
5 243 Kawabata H and Yoshizaki K. 2013. Comparative evaluation of the effects of treatment  
6  
7 244 with tocilizumab and TNF- $\alpha$  inhibitors on serum hepcidin, anemia response and disease  
8  
9 245 activity in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther* 15: R141. doi:  
10  
11 246 10.1186/ar4323.  
12  
13  
14  
15 247 Spivak JL. 2000. The blood in systemic disorders. *Lancet* 355: 1707-1712.  
16  
17  
18 248 van Santen S, de Mast Q, Oosting JD, van Ede A, Swinkels DW and van der Ven AJ.  
19  
20 249 2014. Hematologic parameters predicting a response to oral iron therapy in chronic  
21  
22 250 inflammation. *Haematologica* 99: e171-3. doi: 10.3324/haematol.2014.106799.  
23  
24  
25 251 Vos AC, Wildenberg ME, Duijvestein M, Verhaar AP, van den Brink GR and Hommes  
26  
27 252 DW. 2011. Anti-tumor necrosis factor- $\alpha$  antibodies induce regulatory macrophages in  
28  
29 253 an Fc region-dependent manner. *Gastroenterology* 140: 221-230.  
30  
31  
32  
33 254  
34  
35  
36 255  
37  
38  
39 256  
40  
41  
42 257  
43  
44  
45 258  
46  
47  
48 259  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

260 **Figure Legends**

261

262 **Figure 1.** Peripheral red blood cells (A), haemoglobin (B), hematocrit (C) levels and  
263 erythrocyte sedimentation rate (D) in patients with rheumatoid arthritis (RA) treated or  
264 not with either leflunomide (LFN;  $n=15$ ) or adalimumab (ADA;  $n=15$ ), in comparison  
265 with patients recently diagnosed with RA but not yet receiving specific treatment with  
266 anti-rheumatic drugs (NST group;  $n=10$ ) and healthy subjects ( $n=15$ ). Data are  
267 expressed as mean  $\pm$  SD. \* $p<0.05$ , differs from healthy subjects; # $p<0.05$ , differs from  
268 the NST group.

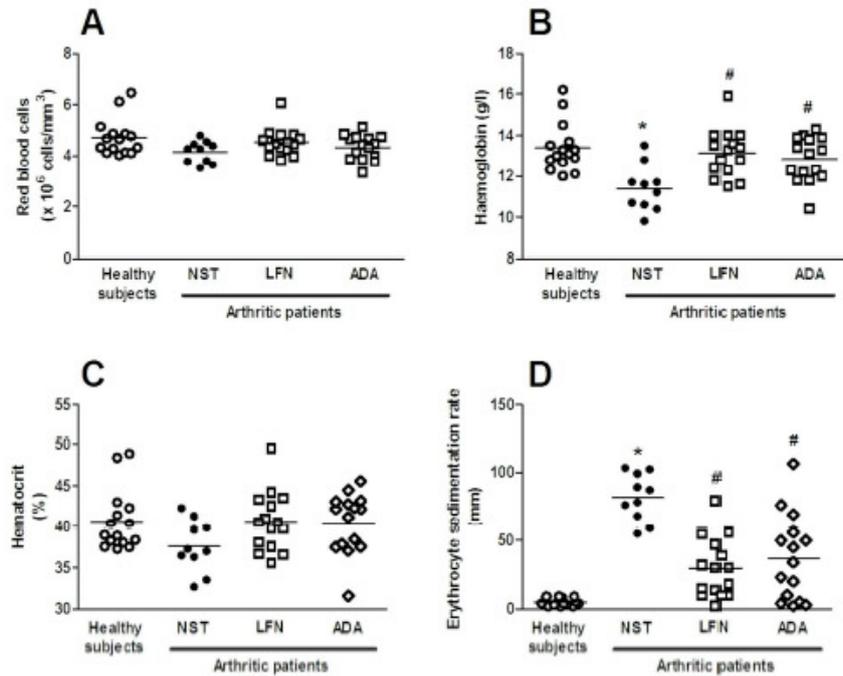


Figure 1. Peripheral red blood cells (A), haemoglobin (B), hematocrit (C) levels and erythrocyte sedimentation rate (D) in patients with rheumatoid arthritis (RA) treated or not with either leflunomide (LFN; n=15) or adalimumab (ADA; n=15), in comparison with patients recently diagnosed with RA but not yet receiving specific treatment with anti-rheumatic drugs (NST group; n=10) and healthy subjects (n=15). Data are expressed as mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , differs from healthy subjects; # $p < 0.05$ , differs from the NST group

98x80mm (300 x 300 DPI)

## 5. CONCLUSÃO

A artrite reumatoide é uma doença auto-imune que frequentemente está associada à incapacidade progressiva, complicações sistêmicas, morte precoce e impacto socioeconômico. A causa da artrite reumatoide é desconhecida, e o prognóstico é muitas vezes imprevisível. Muitos avanços aconteceram no entendimento da patogênese da doença, porém, a falta de resposta ao tratamento em muitos pacientes têm estimulado o desenvolvimento de novas pesquisas em busca de novas perspectivas de tratamento, e dos mecanismos associados à progressão da doença. O presente trabalho concluiu que:

1-A expressão de TRPA 1 em leucócitos de sangue periférico esta aumentada em pacientes artríticos não tratados com terapia específica, e isto está associado ao aumento do número de polimorfonucleares e com a ativação de células CD14<sup>+</sup> assim também como com a dor e com a disfunção articular;

2- O tratamento com Leflunomida e Adalimumab reduzem a expressão do TRPA1, assim como a dor e a incapacidade associada à doença;

3- O tratamento com Leflunomida e Adalimumab previne a anemia relacionada da artrite reumatoide, sendo efetivos tanto no tratamento das alterações intra quanto extra articulares decorrentes da doença;

Por outro lado, não se sabe ao certo, como a expressão/ativação do TRPA1 em células do sangue periférico pode influenciar a anemia, nem mesmo a responsividade ao tratamento. Ainda, o impacto da ativação deste receptor à nível articular, permanece por ser esclarecido.